



"Sapienza" Università degli Studi di Roma
Facoltà di Medicina e Psicologia

*Dottorato di Ricerca in
"Chirurgia"
Ciclo 25°*

Tesi di Dottorato di Ricerca

**Distribuzione delle Cellule $CD4^+CD25^+FoxP3^+$
(Treg) nel Sangue Periferico ed Interazioni
Dinamiche della Reazione Immunitaria nei Pazienti
con Adenocarcinoma del Pancreas**

Relatore:
Chiar.mo Prof.
Antonio Bolognese

Dottoranda
Dott.ssa Valentina La Torre
Matricola: 934429

Anno Accademico 2013-2014

Indice

INTRODUZIONE ED OBIETTIVI	3
MATERIALI E METODI	8
1. <i>Pazienti</i>	8
2. <i>Citofluorometria</i>	12
3. <i>Analisi Statistica</i>	14
RISULTATI	15
DISCUSSIONE	36
1. <i>ORIGINE E SVILUPPO DELLE CELLULE TREG</i>	39
2. <i>MECCANISMO D'AZIONE DELLE CELLULE Treg</i>	45
3. <i>Treg E CANCEROGENESI</i>	46
4. <i>LE CELLULE Tregt NELL' IMMUNOTERAPIA ANTI-TUMORALE E PROSPETTIVE FUTURE</i>	55
CONCLUSIONI	59
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUZIONE

L'Adenocarcinoma del pancreas (ACP) rappresenta il 3% di tutti i tumori e tra i tumori del tratto gastrointestinale una tra le neoplasie maligne dal comportamento più aggressivo⁽¹⁾.

Costituisce allo stato attuale la quinta causa di mortalità per cancro nei paesi occidentali e la sopravvivenza globale è inferiore al 5%⁽¹⁾⁽²⁾.

A causa della sua aggressività e della disseminazione metastatica precoce, solo il 20% dei pazienti può beneficiare di una resezione curativa : dal 20 al 30% si tratta di tumori localmente avanzati. Circa il 50% presenta metastasi a distanza.

Pochi progressi sono stati realizzati negli ultimi anni riguardo al trattamento di questo tumore che resta ancora particolarmente radio e chemio-resistente.

E' stato ampiamente dimostrato come il sistema immunitario giochi un ruolo critico nel controllare la crescita delle cellule tumorali⁽³⁾⁽⁴⁾. Molti pazienti affetti da carcinoma del pancreas presentano un'alterazione della funzione immunitaria capace di incidere sulla progressione tumorale e tale da comprometterne la prognosi⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

Se un funzionamento alterato del sistema immunitario, alla base della tolleranza verso le cellule neoplastiche, è ritenuto responsabile dello sviluppo e della

progressione dei tumori, il meccanismo preciso di regolazione del sistema immunitario nei pazienti con malattia neoplastica è ancora poco conosciuto.

Le cellule T regolatrici $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+\text{CD4}^+$ (Treg) rappresentano dal 5 al 10% dei linfociti CD4^+ e svolgono un ruolo cruciale nella repressione dei disordini autoimmunitari così come nel prevenire il rigetto dei trapianti. E' stato ormai universalmente riconosciuto il loro ruolo chiave anche nella tolleranza immunitaria verso i tumori ⁽⁴⁾.

Il loro coinvolgimento nei confronti dello sviluppo e progressione tumorale nell'uomo è stato suggerito dall'osservazione che i pazienti con una larga varietà di tumori hanno un numero elevato di linfociti T $\text{CD25}^+\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ (Treg) nel sangue periferico, nei linfonodi drenanti e nel tessuto tumorale stesso e ciò è stato correlato in molti casi ad una prognosi sfavorevole e ad una ridotta sopravvivenza nel tumore dell'ovaio, della mammella e dello stomaco in particolare ^{(4) (7) (8)}.

Notevoli progressi sono stati fatti nella comprensione dell'ontogenesi e del meccanismo di azione delle cellule Treg, di cui sono state identificate diverse sottopopolazioni. Tra queste, sono stati individuati due sottogruppi cellulari maggiori: natural o resting Treg (rTreg) e adattative Treg (aTreg), fenotipicamente e funzionalmente diverse ⁽⁹⁾.

La maggior parte di queste cellule sono attratte dal tumore, si espandono localmente per differenziarsi alla fine nel sottogruppo cellulare capace di inibire

fortemente l'attivazione e l'espansione delle cellule T effettrici specificamente dirette contro le cellule tumorali ed i loro TAA (Antigeni Associati al Tumore).

Una correlazione tra l'eccesso di linfociti Treg nel sangue periferico, nei linfonodi drenanti e nel tessuto tumorale ed una prognosi sfavorevole è stata riportata anche nei pazienti affetti da ACP^{(5) (6)}.

L'immunoterapia rappresenta un'opzione terapeutica da esplorare. Per prendere in considerazione questo tipo di approccio terapeutico, é fondamentale definire gli obiettivi e gli attori specifici della risposta immunitaria contro il cancro al fine di poterli manipolare selettivamente.

Risulterebbe pertinente d'altra parte definire i marcatori biologici capaci di predire l'evoluitività della malattia.

La comprensione dell'esatto meccanismo di evasione tumorale, delle interazioni dinamiche tra le differenti sottopopolazioni di cellule Treg coinvolte nella risposta immunitaria ed il significato clinico del loro aumento nel sangue dei pazienti con adenocarcinoma potrebbe guidare la terapia immunologica verso strategie mirate al fine di ridurre in maniera selettiva il numero di cellule Treg o di attenuare la loro attività soppressiva.

E' stato infatti dimostrato che la rimozione delle cellule Treg attraverso l'uso di specifici Anticorpi monoclonali (mAc) è in grado di potenziare l'efficacia della terapia vaccinica contro i tumori⁽¹⁰⁾.

Questo **studio prospettico preliminare** si è dunque proposto di stabilire:

- la distribuzione delle cellule Foxp3^+ Treg circolanti nei pazienti con ACP.
- quale specifica sottopopolazione di cellule $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^+\text{CD4}^+$ Treg sia correlata allo sviluppo ed alla progressione tumorale e di valutarne il significato clinico-patologico.

La finalità è quella di contribuire ad individuare un bersaglio preciso per la terapia immunologica al fine di rendere l'approccio terapeutico il più efficace e mirato possibile, senza, d'altra parte, compromettere il fisiologico funzionamento del nostro sistema difensivo.

Al fine di verificare la distribuzione dei linfociti Treg nel sangue periferico dei pazienti con carcinoma del pancreas, la proporzione di cellule Foxp3^+ Treg circolanti, come percentuale dei linfociti T CD4^+ , e quella dei due sottogruppi cellulari principali, aTreg e rTreg, è stata comparata a quella di volontari sani.

La proporzione delle differenti sottopopolazioni cellulari di cellule Treg nei pazienti con ACP metastatico è stata inoltre comparata a quella dei pazienti con ACP localizzato.

Un'analisi complementare è stata effettuata tra i pazienti con ACP ed i pazienti affetti da differenti malattie infiammatorie del tratto gastrointestinale.

Inoltre, lo stesso studio è stato effettuato tra i pazienti con ACP ed i pazienti operati di tumore coloretale.

La percentuale di cellule Treg circolanti è stata inoltre correlata con le caratteristiche clinico-patologiche e prognostiche.

MATERIALI E METODI

1. Pazienti

Nel periodo compreso tra Novembre 2010 e Marzo 2012 sono stati raccolti in maniera prospettica 29 casi di pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico, afferenti al Dipartimento di Chirurgia Generale, Epatobiliopancreatica e Trapianti di Fegato dell'Ospedale Universitario La Pitié-Salpêtrière di Parigi.

I pazienti con tumori differenti dall'Adenocarcinoma, ed i pazienti deceduti entro 30 giorni postoperatori sono stati esclusi dallo studio. Nessun paziente ha ricevuto una terapia neoadiuvante che potesse alterare il sistema immunitario. Nessun paziente presentava una storia clinica di malattia autoimmune o di infezione recente.

Di questi 29 pazienti 17 erano donne e 12 uomini con età media di 66 anni.

Tra i pazienti sottoposti ad intervento chirurgico resettivo, 19 hanno beneficiato di una duodenocefalopancreasectomia, 2 di una pancreasectomia distale, 1 paziente di una pancreasectomia totale. Una linfadenectomia standard è stata effettuata su tutti i pazienti. Cinque pazienti con malattia metastatica sono stati sottoposti ad intervento palliativo di derivazione biliopancreatica. Altri 5 pazienti, d'emblée metastatici, sono stati sottoposti a trattamento chemioterapico.

Lo stadio tumorale è stato definito sulla base della classificazione TNM secondo l'AJCC 2010 ⁽¹¹⁾ : T1 (4), T3(14), T4(11). Metastasi linfonodali sono state ritrovate in 25 pazienti (Fig. 1).

Fig 1. Pazienti e caratteristiche tumorali

N° di casi	29
Età media	66,1
M/F	12/17
Volume (cm) media (4,5-1,2)	2,8
Intervento chirurgico	
DPC	19
SPG	2
DPT	1
DERIVAZIONE BILIOPANCREATICA	5
pTNM (WHO 2010)	
<i>Tumore</i>	
pT1	3
pT2	0
pT3	21
pT4	5
<i>Linfonodi</i>	
pN0	5
pN1	24
<i>Metastasi</i>	
pM0	19
pM1	10
Stadio	
IA	3
IIA	2
IIB	13
III	1
IV	10
Grado	
1	3
2	8
3	18

Margini chirurgici pancreatici

R0	R1	R2
19	3	0

L'87,5% dei pazienti ha beneficiato di una resezione R0 ed il 12,5% di una resezione R1.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un controllo radiologico ed ematico postoperatorio ogni 3 mesi. La diagnosi di RLR o a distanza è stata posta in presenza di una formazione nodulare alla TC o alla RM ed in presenza di un aumento esponenziale dei marcatori tumorali (CA 19-9 o CEA).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad un follow-up minimo di 6 mesi e mediano di 28 mesi.

La proporzione di linfociti $CD4^{+}CD25^{+++}CD45RA^{-}Foxp3^{hi}$ (aTreg) e $CD4^{+}CD25^{++}CD45RA^{+}Foxp3^{low}$ (nTreg) dei 29 pazienti con adenocarcinoma del pancreas, ottenuta mediante esame citofluorimetrico, è stata comparata a quella di 106 volontari sani, 14 pazienti affetti da differenti patologie infiammatorie benigne del tratto digerente e 32 pazienti affetti da tumore coloretale. Un consenso informato è stato firmato da tutti i volontari e da tutti i pazienti.

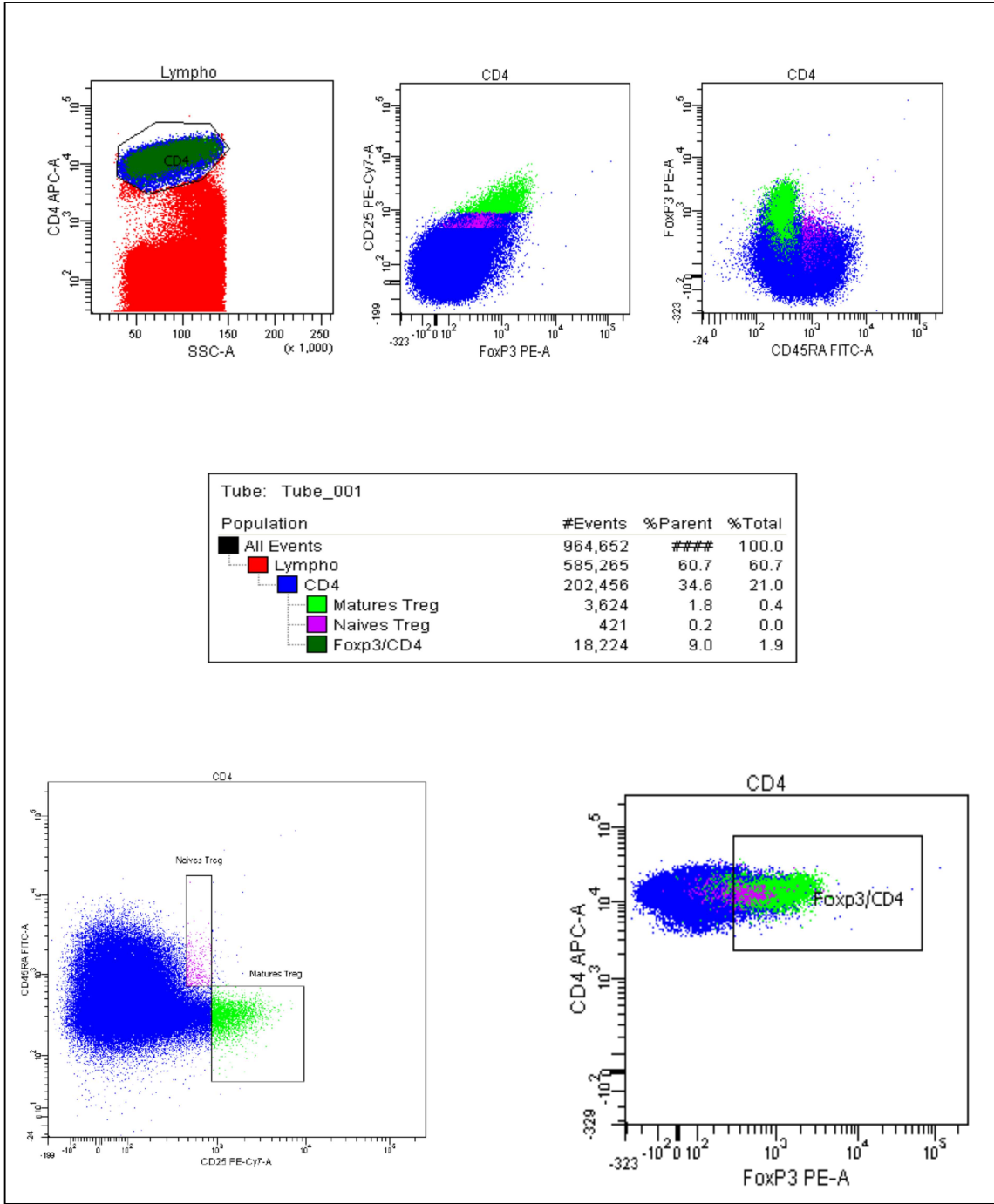
Lo studio è stato approvato dal Comitato di Protezione Etica "Ile-de-France Paris VI".

Dieci ml di sangue sono stati raccolti in una provetta EDTA da tutti i partecipanti allo studio. I pazienti con carcinoma del pancreas e del colon sono stati prelevati prima dell'intervento chirurgico.

2. Citofluorometria

Le cellule mononucleate del sangue periferico raccolte in una provetta di 7 ml sono state preparate con un gradiente di centrifugazione (Ficoll). Dopo aver fissato e permeabilizzato le cellule (Cytofix/Cytoperm,e-Bioscience), il fenotipo linfocitario è stato determinato incubando le cellule per 20 min a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi: CD45RA FITC (ref A07786 de Beckman Coulter), CD4 APC ref 345771 de Becton Dickinson (BD), CD25PE-Cy7 ref 335824 de BD, FoxP3 PE ref 560046 de BD. Infine, il fenotipo e la proporzione di ciascuna sottopopolazione sono state analizzate al FACS (Fig 2).

Fig.2. Analisi fluorocitometrica (FACS, BD Bioscience) delle cellule mononucleate del sangue in un paziente con ACP.



3. Analisi Statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il Software MedCalc per Windows, versione 10.2.0.0 (MedCalc Software, MariaKerke, Belgium). Le differenze nelle distribuzioni sono state calcolate utilizzando il test chi-quadro od il test di Fisher a seconda del numero dei casi nei vari sottogruppi. Le sopravvivenze sono state calcolate con il metodo di Kaplan-Meier, e le differenze valutate attraverso le medie del “log-rank test”^{(12) (13)}.

La sopravvivenza collettiva è definita come l’intervallo di tempo tra chirurgia e decesso senza tener conto della causa di morte.

Il $p < 0.1$ è stato utilizzato come valore cut-off per la significatività statistica nella selezione di variabili dell’analisi multivariata, al fine di non tralasciare importanti potenziali fattori predittivi.

La significatività statistica è convenzionalmente definita con un $p < 0.05$ in tutti i casi considerati.

RISULTATI

1. *Proporzione di cellule Foxp3⁺/CD4⁺ circolanti nei pazienti con ACP e nei controlli*

La percentuale di cellule Foxp3⁺/CD4⁺ nei pazienti con ACP è risultata più elevata rispetto ai controlli, sia in rapporto alla malattia metastatica che localizzata ($P=0,007$) (Fig.3)

Fig.3. *Proporzione di cellule Foxp3⁺/CD4⁺ circolanti nei pazienti con ACP e nei controlli*

Data	FoxP3_CD4 FoxP3/CD4
Factor codes	
Sample size	72

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	6,515
DF 1	2
DF 2	69
Significance level	P = 0,003

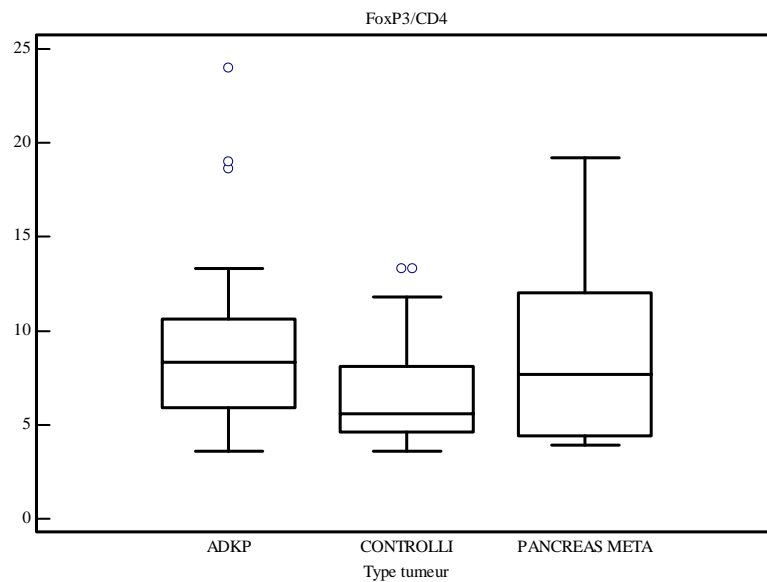
ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	171,3342	2	85,6671
Within groups (other fluctuations)	1124,2790	69	16,2939
Total	1295,6132	71	

F-ratio	5,258
Significance level	P = 0,007

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different (P<0.05) from factor nr
(1) ACP	19	9,6842	(2)
(2) CONTROLLI	43	6,3977	(1)(3)
(3) ACP META	10	9,2400	(2)



2. Distribuzione dei differenti sottogruppi cellulari di Linfociti $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nei pazienti affetti da ACP e nei controlli.

L'analisi della percentuale di $CD4^+Foxp3^+$ Treg tra tutte le cellule mononucleate del sangue periferico e lo studio mirato degli specifici sottogruppi, ha messo in evidenza un aumento significativo del numero di cellule $CD4^+CD25^{+++}Foxp3^{hi}$ Treg nei pazienti con ACP rispetto ai controlli ($P=0,01$) (Fig.4).

Fig.4a. Distribuzione delle cellule aTreg nei pazienti con ACP ed i controlli.

Data	a_Treg__%_
Factor codes	a Treg (%)

Sample size	135
-------------	-----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	13,172
DF 1	2
DF 2	132
Significance level	P < 0,001

ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	10,0072	2	5,0036
Within groups (other fluctuations)	148,6167	132	1,1259
Total	158,6240	134	

F-ratio	4,444
Significance level	P = 0,014

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different (P<0.05) from factor nr
(1) ACP	19	2,5316	(2)
(2) CONTROLLI	106	1,8895	(1)
(3) ACP META	10	2,5900	

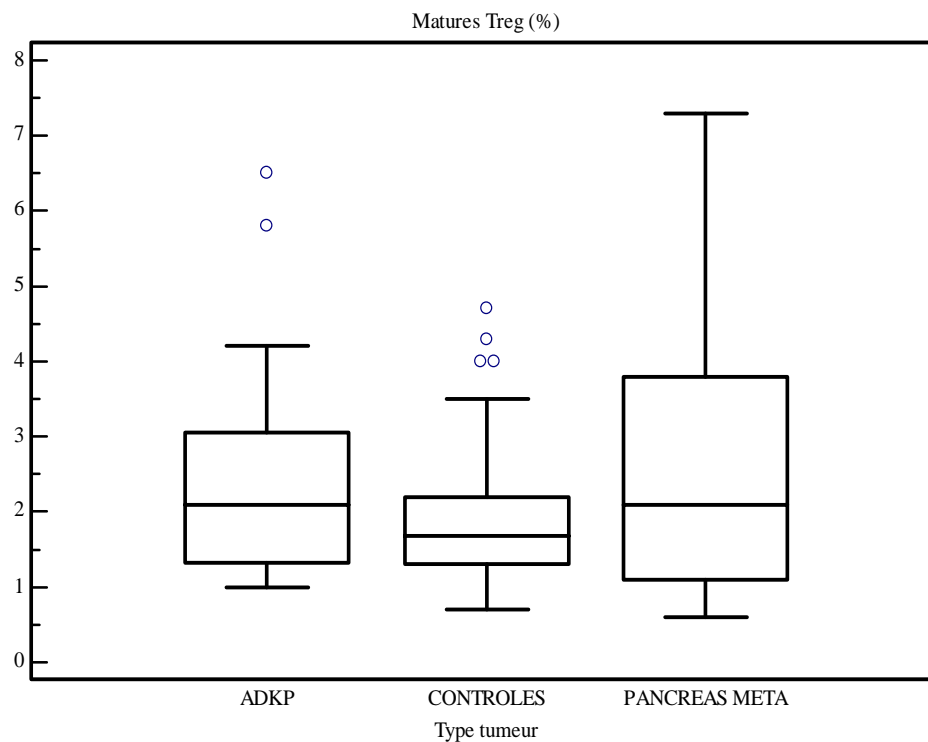


Fig.4b. Distribuzione delle cellule rTreg nei pazienti con ACP e nei controlli.

Data	r_Treg_%_r Treg (%)
Factor codes	Type_tumeur Type tumeur

Sample size	135
-------------	-----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	11,834
DF 1	2
DF 2	132
Significance level	P < 0,001

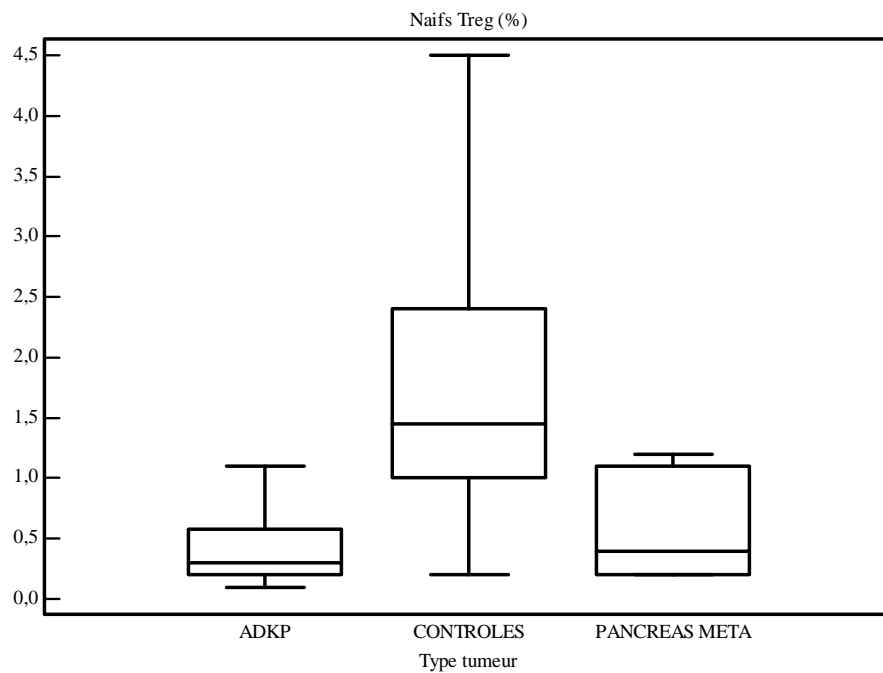
ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	33,9473	2	16,9737
Within groups (other fluctuations)	110,6002	132	0,8379
Total	144,5475	134	

F-ratio	20,258
Significance level	P < 0,001

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different (P<0.05) from factor nr
(1) ACP	19	0,4053	(2)
(2) CONTROLLI	106	1,6859	(1)(3)
(3) ACP META	10	0,5900	(2)



3. La percentuale ed il numero assoluto di cellule aTreg nei pazienti con ACP metastatico è risultata più elevata rispetto ai pazienti con malattia localizzata ($P=0,001$; $P=0,005$)(Fig.5)

Fig.5a. Confronto della percentuale di cellule aTreg nei pazienti con ACP metastatico e localizzato.

Data	aTreg_%_ aTreg (%)
Factor codes	

Sample size	29
-------------	----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	25,575
DF 1	1
DF 2	27
Significance level	$P < 0,001$

ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	4,3378	1	4,3378
Within groups (other fluctuations)	9,1408	27	0,3385
Total	13,4786	28	

F-ratio	12,813
Significance level	$P = 0,001$

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different ($P < 0.05$) from factor nr
(1) ACP	19	0,3263	(2)
(2) ACP META	10	1,1400	(1)

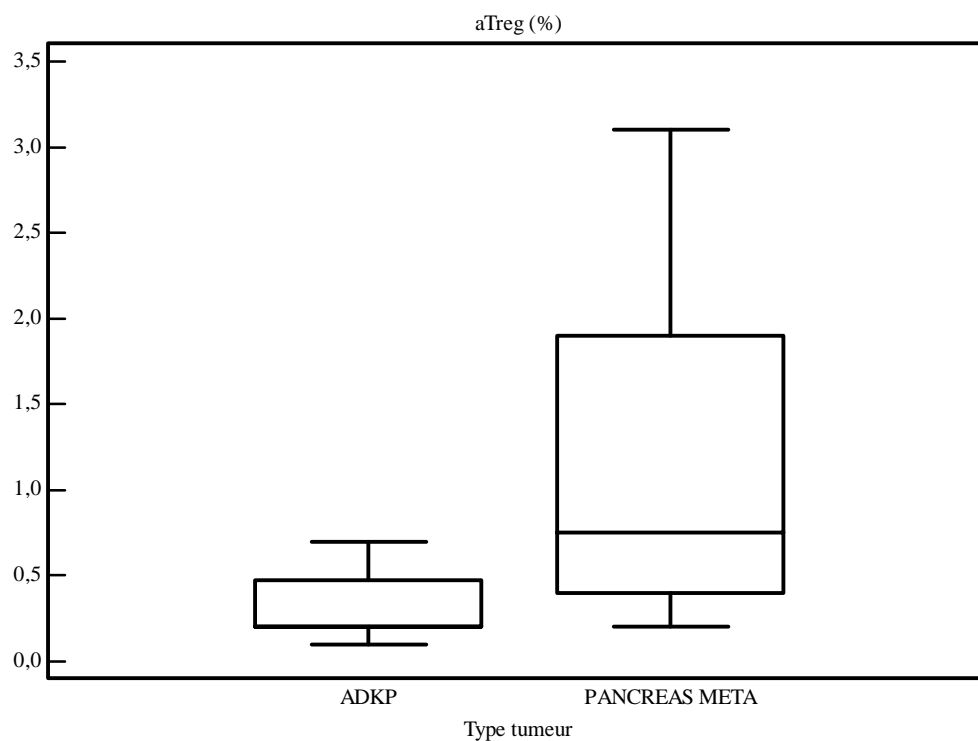


Fig.5b. Confronto del valore assoluto delle cellule aTreg tra i pazienti con ACP metastatico e localizzato.

Data	aTreg____ aTreg ()
Factor codes	

Sample size	29
-------------	----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	13,175
DF 1	1
DF 2	27
Significance level	P = 0,001

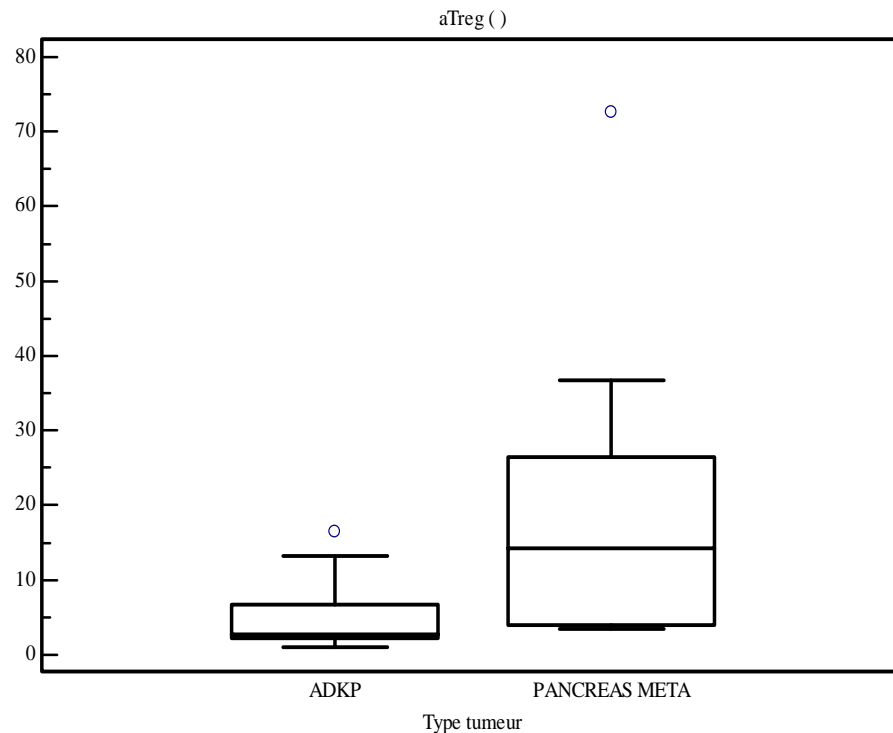
ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	1529,0539	1	1529,0539
Within groups (other fluctuations)	4406,3882	27	163,1996
Total	5935,4421	28	

F-ratio	9,369
Significance level	P = 0,005

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different (P<0.05) from factor nr
(1) ACP	19	4,7632	(2)
(2) ACP META	10	20,0400	(1)



4. Distribuzione dei differenti sottogruppi cellulari di Linfociti $CD4^+CD25^{+++}FoxP3^{hi}$ nei pazienti con ACP e nei pazienti con malattie infiammatorie dell'apparato digerente

Un aumento significativo della percentuale e del numero assoluto di cellule $CD4^+CD25^{+++}FoxP3^{hi}$ Treg è stato dimostrato nei pazienti affetti da adenocarcinoma del pancreas rispetto ai pazienti con malattie infiammatorie dell'intestino ($P < 0,001$; $P = 0,002$) (Fig. 6).

Fig.6a. Confronto della percentuale di cellule aTreg nei pazienti con ACP e con malattie infiammatorie dell'apparato digerente.

Data	aTreg_%_ aTreg (%)
Factor codes	
Sample size	43

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	18,413
DF 1	2
DF 2	40
Significance level	$P < 0,001$

ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	4,6626	2	2,3313
Within groups (other fluctuations)	10,0444	40	0,2511
Total	14,7070	42	

F-ratio	9,284
Significance level	$P < 0,001$

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	N	Mean	Different ($P < 0.05$) from factor nr
(1) ACP	19	0,3263	(3)
(2) M.INFIAMMATO RIE	14	0,4214	(3)
(3) ACP META	10	1,1400	(1)(2)

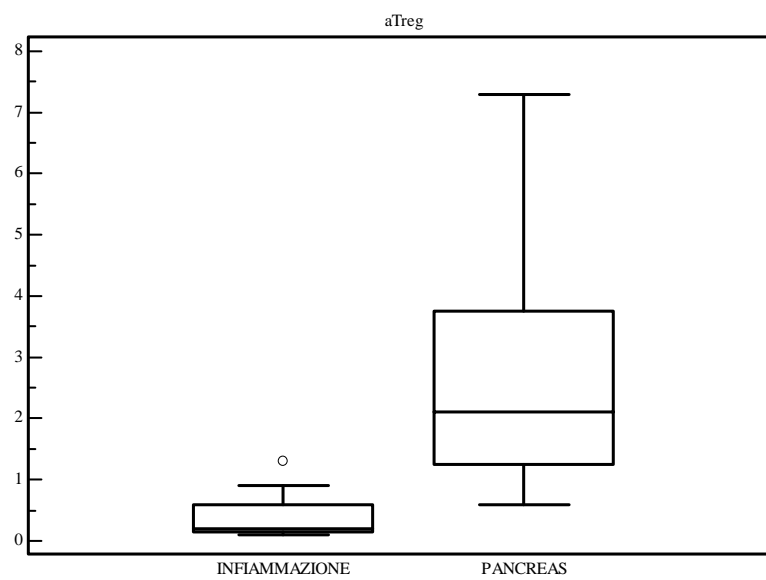
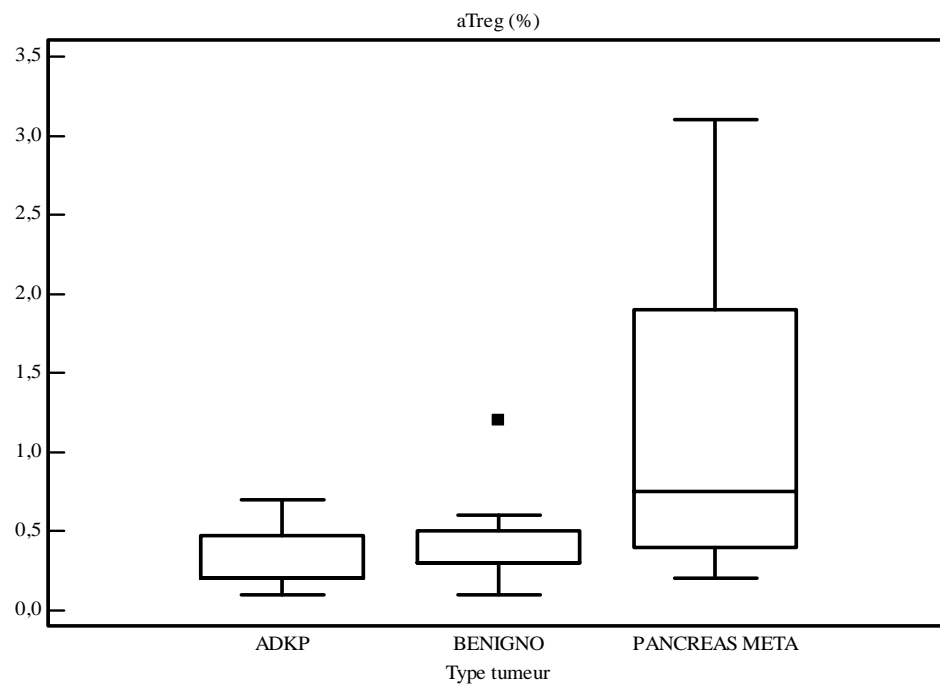


Fig.6b. Confronto del valore assoluto delle cellule aTreg tra i pazienti con ACP e con malattie infiammatorie dell'apparato digerente.

Data	aTreg____ aTreg ()
Factor codes	

Sample size	43
-------------	----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	11,340
DF 1	2
DF 2	40
Significance level	P < 0,001

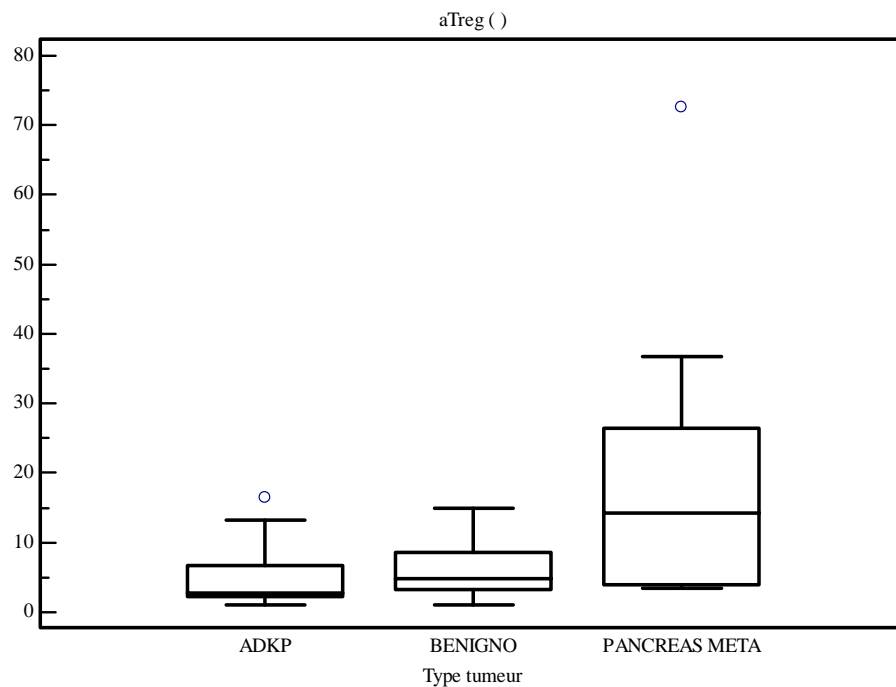
ANOVA

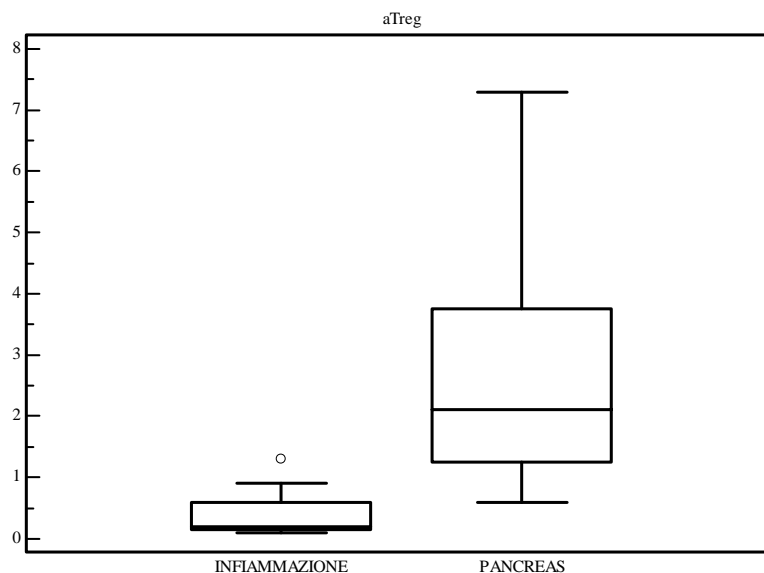
Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	1687,4094	2	843,7047
Within groups (other fluctuations)	4583,1804	40	114,5795
Total	6270,5898	42	

F-ratio	7,363
Significance level	P = 0,002

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different (P<0.05) from factor nr
(1) ACP	19	4,7632	(3)
(2) M.INFIAMMATORIE	14	5,9357	(3)
(3) ACP META	10	20,0400	(1)(2)





5. Distribuzione dei differenti sottogruppi cellulari di Linfociti $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nei pazienti affetti da ACP e nei pazienti con carcinoma coloretale.

La percentuale di cellule $CD4^+CD25^{+++}Foxp3^{hi}$ Treg è risultata significativamente più elevata nei pazienti affetti da ACP rispetto ai pazienti affetti da carcinoma coloretale ($P<0,001$) (Fig.7).

Fig.7a. Confronto della percentuale delle cellule aTreg nei pazienti con ACP e tumore del colon-retto.

Data	aTregmat%
Factor codes	
Sample size	56

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	30,606
DF 1	1
DF 2	54
Significance level	P < 0,001

ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	68,0215	1	68,0215
Within groups (other fluctuations)	80,4181	54	1,4892
Total	148,4396	55	

F-ratio	45,676
Significance level	P < 0,001

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different (P<0.05) from factor nr
(1) ACC	32	0,4687	(2)
(2) ACP	24	2,6958	(1)

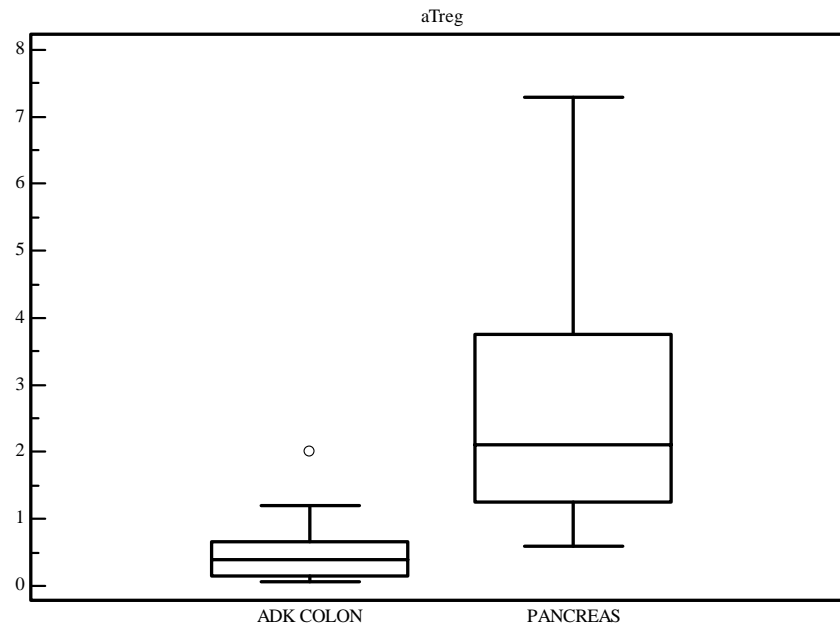


Fig.7b. Confronto della percentuale e del valore assoluto delle cellule aTreg nell'ACP metastatico e nell'ACC ($P < 0,001$; $P < 0,001$)

Data	aTreg__%_ aTreg (%)
Factor codes	

Sample size	61
-------------	----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	16,770
DF 1	2
DF 2	58
Significance level	$P < 0,001$

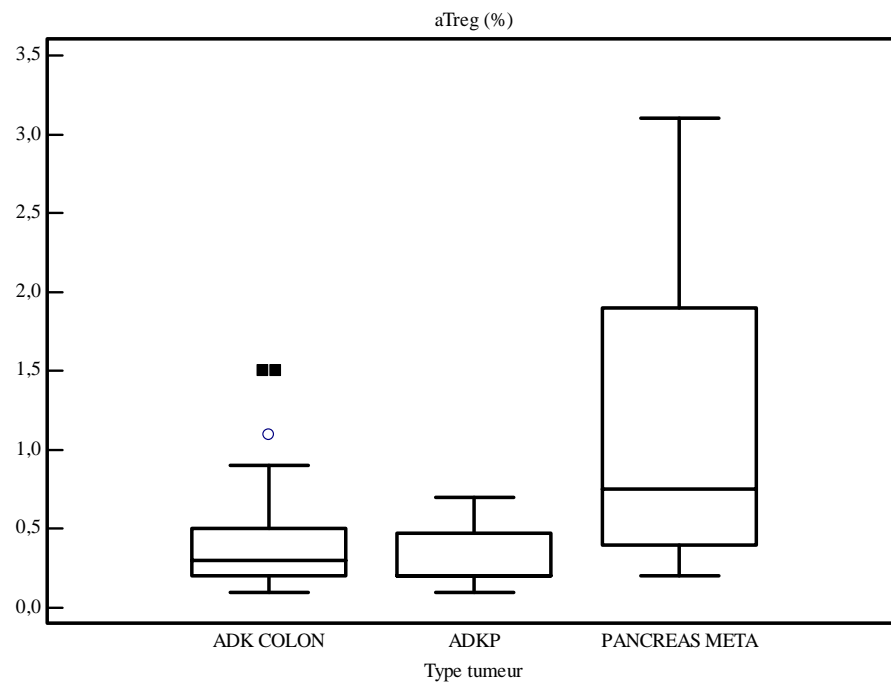
ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	4,8586	2	2,4293
Within groups (other fluctuations)	13,2155	58	0,2279
Total	18,0741	60	

F-ratio	10,662
Significance level	$P < 0,001$

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	N	Mean	Different ($P < 0.05$) from factor nr
(1) ACC	32	0,4219	(3)
(2) ACP	19	0,3263	(3)
(3) ACP META	10	1,1400	(1)(2)



Data	aTreg
Factor codes	aTreg ()

Sample size	61
-------------	----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	15,170
DF 1	2
DF 2	58
Significance level	P < 0,001

ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	1722,1063	2	861,0532
Within groups (other fluctuations)	5089,4570	58	87,7493
Total	6811,5633	60	

F-ratio	9,813
Significance level	P < 0,001

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different (P<0.05) from factor nr
(1) ACC	32	6,4687	(3)
(2) ACP	19	4,7632	(3)
(3) ACP META	10	20,0400	(1)(2)

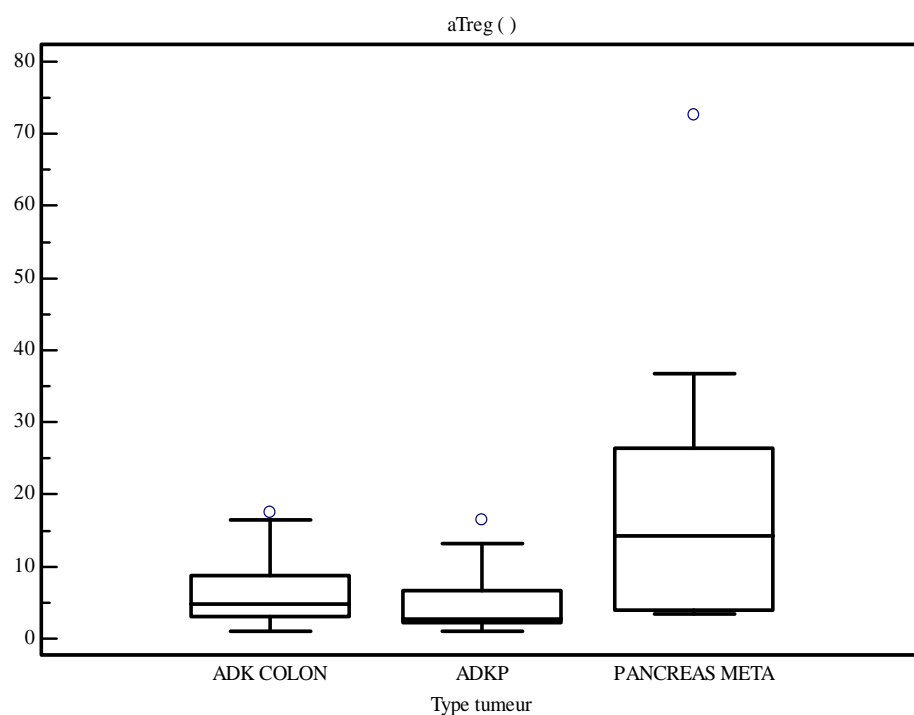


Fig 7c. Confronto della percentuale di cellule aTreg nei pazienti con ACP, malattie infiammatorie del tratto digerente e ACC ($P < 0,001$)

Data	aTreg__%_ aTreg (%)
Factor codes	

Sample size	75
-------------	----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	13,340
DF 1	3
DF 2	71
Significance level	$P < 0,001$

ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	4,9476	3	1,6492
Within groups (other fluctuations)	14,1191	71	0,1989
Total	19,0667	74	

F-ratio	8,293
Significance level	$P < 0,001$

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	N	Mean	Different ($P < 0.05$) from factor nr
(1) ACC	32	0,4219	(4)
(2) ACP	19	0,3263	(4)
(3) M.INFIAMMATO RIE	14	0,4214	(4)
(4) ACP META	10	1,1400	(1)(2)(3)

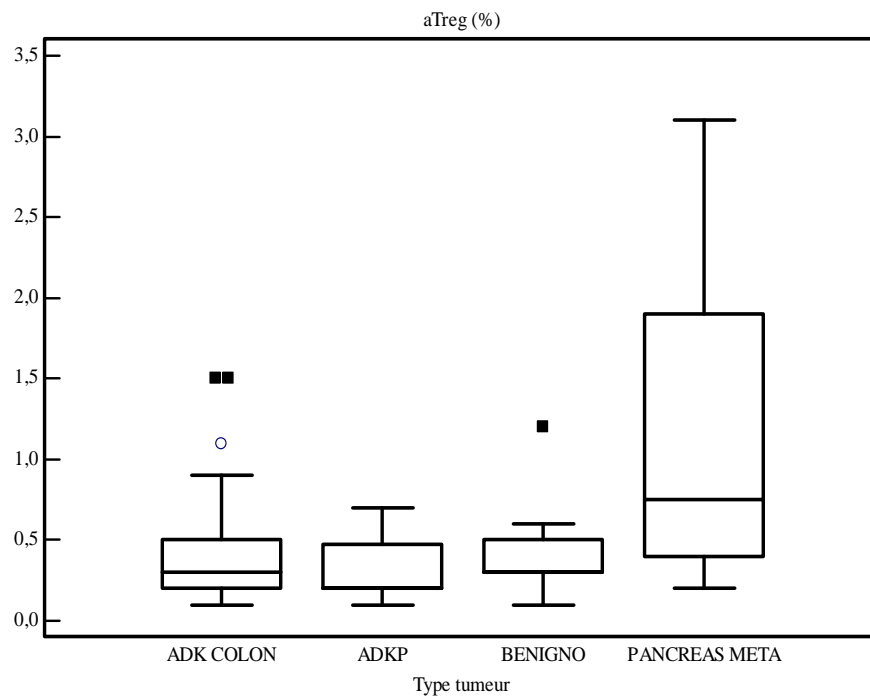


Fig 7d. Confronto della percentuale di cellule rTreg nei pazienti con ACP, malattie infiammatorie del tratto digerente e ACC ($P < 0,001$)

Data	r_Treg_%_ r Treg (%)
Factor codes	

Sample size	181
-------------	-----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	9,562
DF 1	4
DF 2	176
Significance level	$P < 0,001$

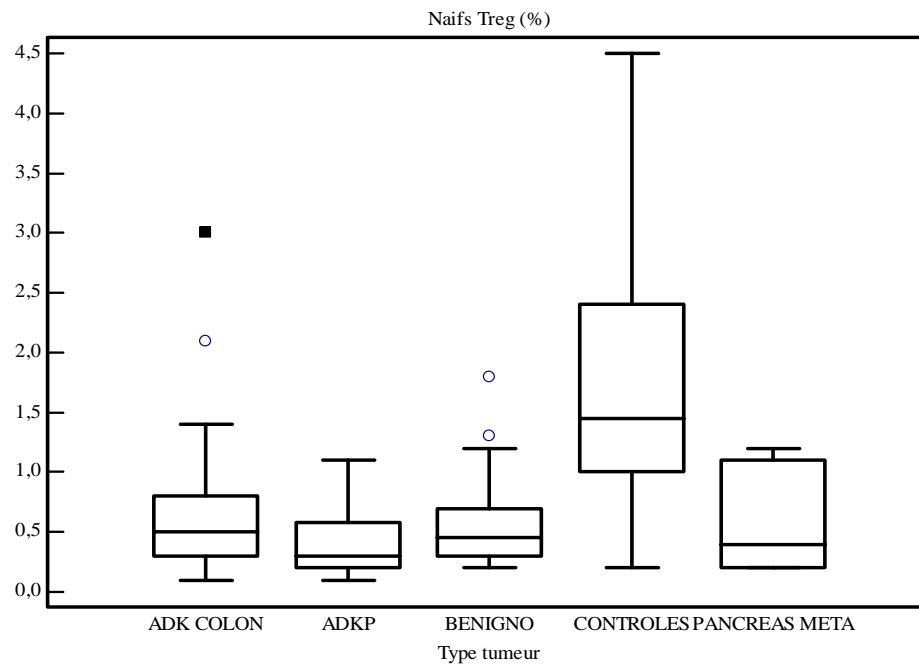
ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	53,4272	4	13,3568
Within groups (other fluctuations)	124,7560	176	0,7088
Total	178,1831	180	

F-ratio	18,843
Significance level	$P < 0,001$

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	N	Mean	Different ($P < 0.05$) from factor nr
(1) ACC	32	0,6906	(4)
(2) ACP	19	0,4053	(4)
(3) M.INFIAMMAT ORIE	14	0,6286	(4)
(4) CONTROLLI	106	1,6859	(1)(2)(3)(5)
(5) ACP META	10	0,5900	(4)



6. Una correlazione è stata trovata tra la percentuale di cellule *Foxp3*⁺*aTreg* e lo Stadio nei pazienti operati di ACP ($P=0,04$) (Fig.8). Nessuna correlazione è stata trovata con il Grado di differenziazione e con la sopravvivenza.

Fig. 8. Correlazione tra cellule *CD4*⁺*CD25*⁺⁺⁺*Foxp3*^{hi} Treg e Stadio

Data	aTreg_%_
Factor codes	STADIO

Sample size	29
-------------	----

Levene's Test for Equality of Variances

Levene statistic	6,165
DF 1	4
DF 2	24
Significance level	$P = 0,001$

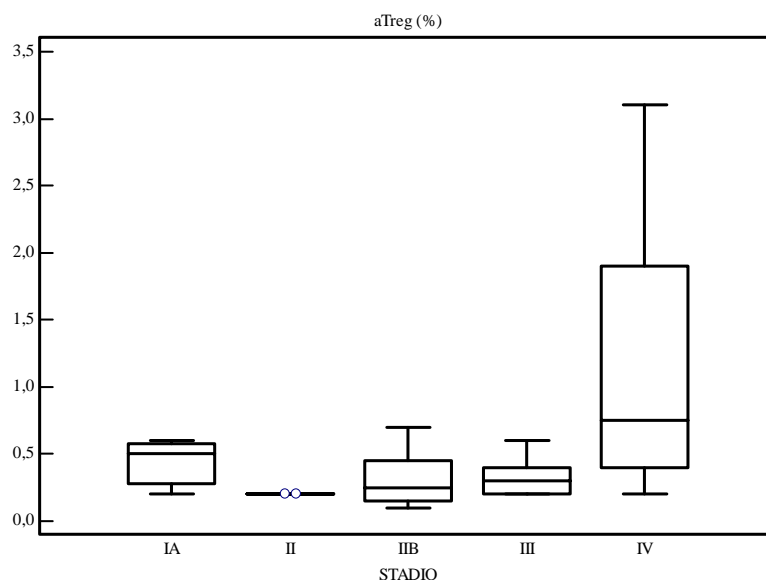
ANOVA

Source of variation	Sum of squares	DF	Mean square
Between groups (influence factor)	4,4059	4	1,1015
Within groups (other fluctuations)	9,0727	24	0,3780
Total	13,4786	28	

F-ratio	2,914
Significance level	$P = 0,043$

Student-Newman-Keuls test for all pairwise comparisons

Factor	n	Mean	Different ($P < 0.05$) from factor nr
(1) IA	3	0,4333	
(2) II	2	0,2000	
(3) IIB	8	0,3125	(5)
(4) III	6	0,3333	(5)
(5) IV	10	1,1400	(3)(4)



7. Una correlazione significativa è presente tra la percentuale di cellule $Foxp3^+/CD4^+$, tra le cellule $CD4^+CD25^{+++}Foxp3^{hi}$ Treg e l'età dei pazienti con ACP ($P=0,011$; $P=0,039$) (Fig 9)

Fig. 9a. Correlazione tra $Foxp3^+/CD4^+$ ed età dei pazienti con ACP ($P=0,011$).

Dependent Y	FoxP3_CD4 FoxP3/CD4
Independent X	

Sample size	24
Coefficient of determination R^2	0,2589
Residual standard deviation	4,9610

Regression Equation

$$y = -6,1850 + 0,2484 x$$

Parameter	Coefficient	Std. Error	t	P
Intercept	-6,1850	5,9852	-1,0334	0,3127
Slope	0,2484	0,0896	2,7720	0,0111

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	189,1080	189,1080
Residual	22	541,4453	24,6111

F-ratio	7,6838
Significance level	P=0,011

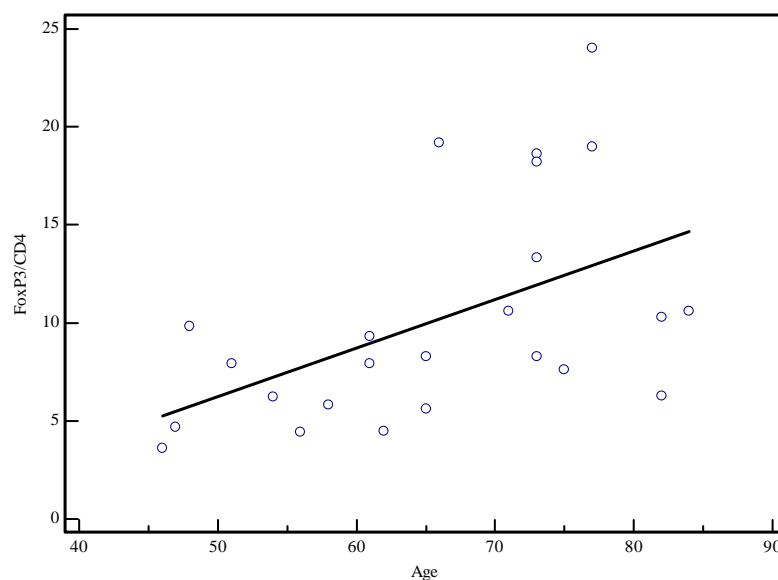


Fig.9b. Correlazione tra aTreg ed età dei pazienti con ACP ($P=0,039$).

Dependent Y	aTregmat%		
Independent X			

Sample size	29
Coefficient of determination R^2	0,1489
Residual standard deviation	1,7157

Regression Equation

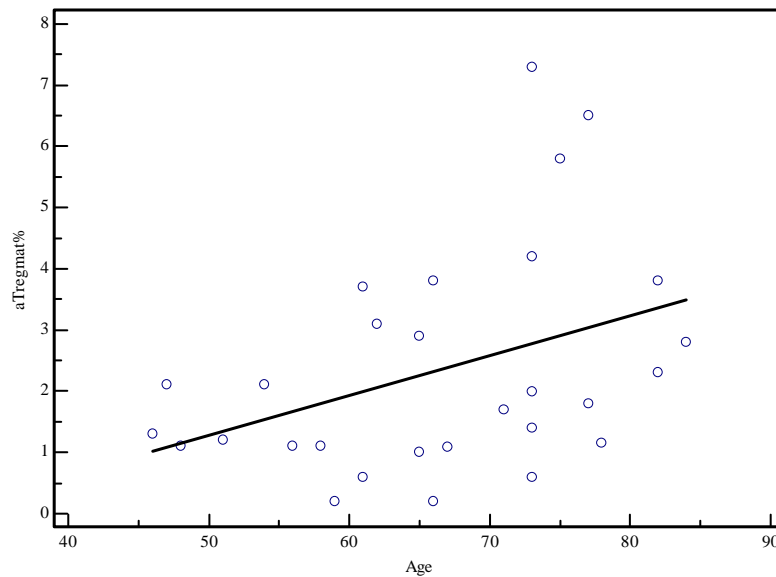
$$y = -1,9576 + 0,06485 x$$

Parameter	Coefficient	Std. Error	t	P
Intercept	-1,9576	2,0041	-0,9768	0,3373
Slope	0,06485	0,02984	2,1733	0,0387

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	13,9031	13,9031
Residual	27	79,4756	2,9435

F-ratio	4,7233
Significance level	$P=0,039$



Questa Ricerca ha dunque messo in evidenza, attraverso l'analisi del rapporto $\text{Foxp3}^+/\text{CD4}^+$, aumentato nei pazienti con ACP rispetto ai controlli, un diretto coinvolgimento delle cellule Treg nell'immuno-patogenesi tumorale.

E' stata dimostrata in Letteratura ⁽⁹⁾ l'esistenza di interazioni dinamiche nella differenziazione delle diverse sottopopolazioni di cellule regolatrici in condizioni normali e patologiche.

Sulla scia di tali studi, in questa Ricerca viene dimostrato che l'aumento delle cellule Treg circolanti concerne prevalentemente il pool di cellule $CD25^{+++}Foxp3^{hi}$ Treg rispetto alle cellule $CD25^{++}Foxp3^{low}$ Treg nei pazienti con ACP.

Inoltre, l'aumento delle cellule aTreg nei pazienti con ACP metastatico rispetto ai pazienti con malattia localizzata, indica come la persistente e progressiva sollecitazione tumorale contribuisca ad alterare la risposta immunitaria nei confronti delle cellule tumorali metastatiche, selezionando il sottogruppo di cellule $Foxp3^{+}$ Treg con il più elevato potere inibitorio nei confronti della risposta immunitaria anti-tumorale ed incidendo, in tal modo, sulla progressione tumorale e quindi sulla prognosi.

Questi risultati consentono di definire nell'incremento delle cellule aTreg, rispetto al pool totale di cellule $CD4^{+}Foxp3^{+}$ Treg, un bersaglio preciso per un approccio immuno-terapico mirato.

Inoltre, l'aumento delle cellule aTreg circolanti nei pazienti con ACP rispetto ai pazienti operati di adenocarcinoma coloretale indica come ciascun tumore abbia una sua specificità per quanto concerne la composizione del pool di cellule $Foxp3^{+}$. Questo risultato trova conferma in un lavoro recente che mostra come nel tumore del colon la percentuale di linfociti T $Foxp3^{+}$ circolanti e nel tessuto tumorale comprenda prevalentemente cellule $Foxp3^{+}$ non-Treg che producono citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6), oltre alle cellule aTreg. Questo spiega

anche perchè l'aumento delle cellule Foxp3^+ sia correlato ad una prognosi migliore rispetto ai pazienti con ACP⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾.

La correlazione tra l'aumento delle cellule aTreg e l'età dei pazienti indica come l'esposizione alla stimolazione antigenica comporti nel tempo un aumento del sottogruppo attivato e funzionalmente differenziato delle cellule Treg. Le cellule aTreg possono essere infatti considerate come delle cellule effettrici mature ad uno stadio terminale di differenziazione, fenotipicamente soppressive e ad alto turnover in conseguenza della loro suscettibilità all'apoptosi⁽⁹⁾.

Mentre ulteriori studi si rivelano necessari per determinare i meccanismi precisi che regolano questo aumento delle cellule regolatrici ed in che misura e attraverso quale meccanismo l'aumento delle aTreg sia dovuto alla conversione delle cellule $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ rTreg o piuttosto delle cellule T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ non-Treg.

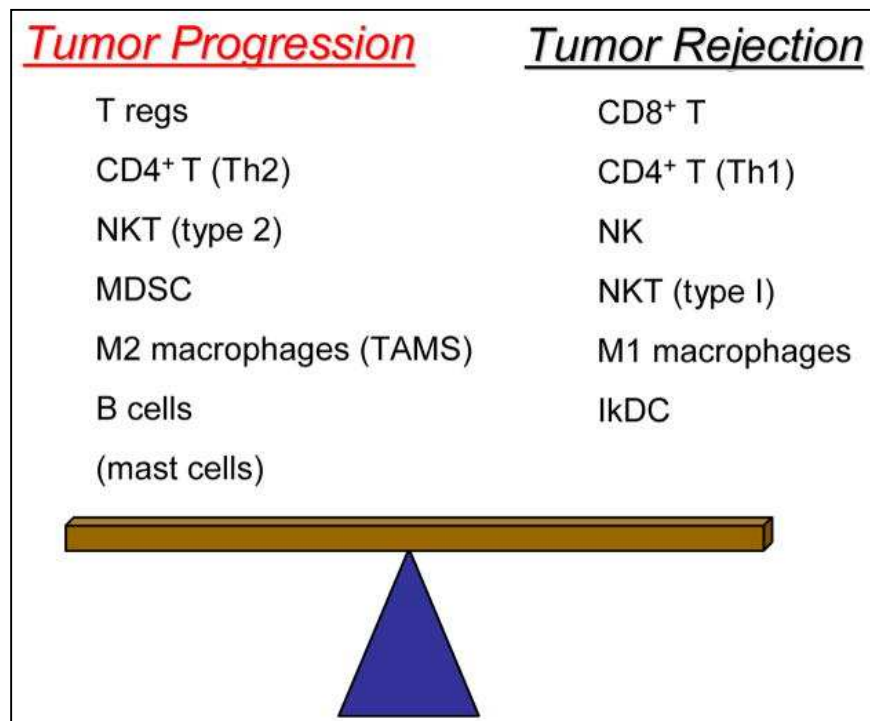
DISCUSSIONE

Molti antigeni tumorali riconosciuti dai linfociti sono dei costituenti antigenicamente normali del nostro organismo ⁽¹⁶⁾. Questo spiega perchè l'immunità tumorale è in parte un'autoimmunità e come il meccanismo di mantenimento della tolleranza immunologica possa compromettere l'efficacia dell'immunità antitumorale ⁽¹⁷⁾.

Se è stato ormai ampiamente messo in evidenza il ruolo del sistema immunitario nel controllare la crescita delle cellule tumorali ⁽¹⁸⁾, non è ancora chiaro il meccanismo preciso attraverso il quale le cellule tumorali sfuggano a questo controllo.

Il sistema immunitario ha la capacità sia di bloccare lo sviluppo del tumore sia di promuovere la carcinogenesi, la progressione tumorale e le metastasi. La prevalenza dell'una o dell'altra condizione dipende dal rapporto tra i mediatori pro- o anti-tumorali della risposta immunitaria innata ed adattativa ⁽¹⁹⁾. (Fig.10)

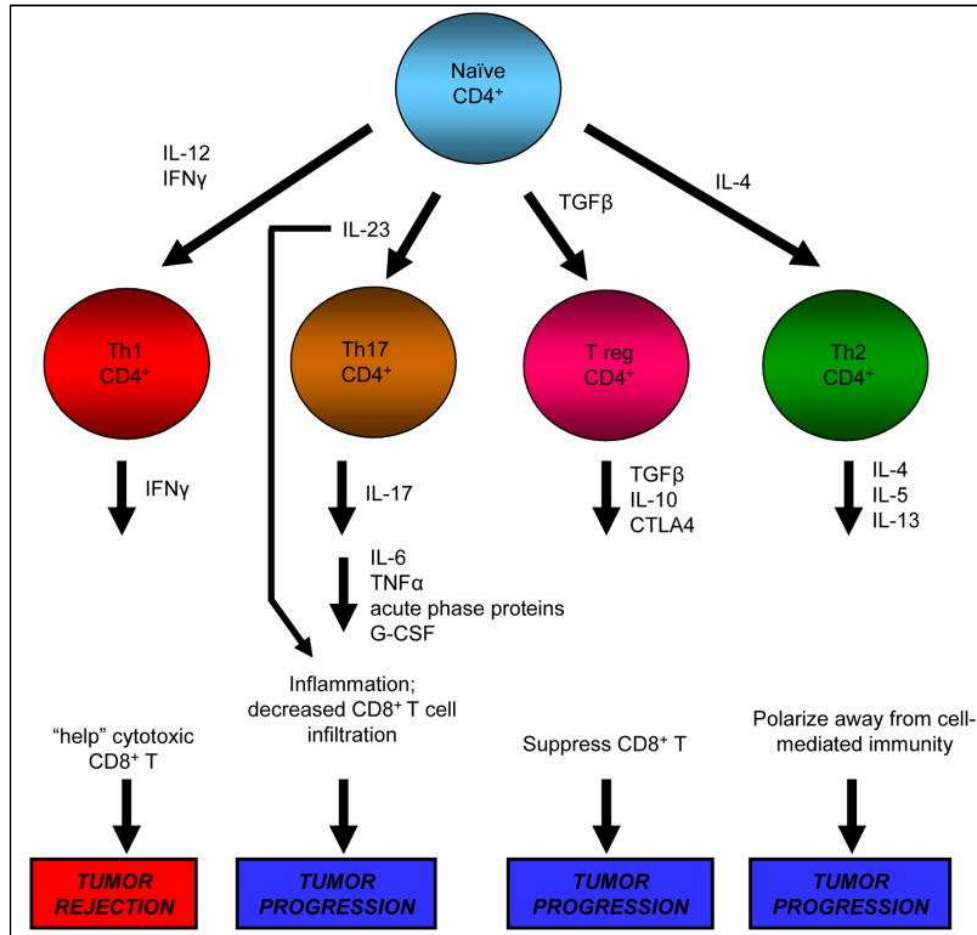
Fig.10



Tumor immunity is a balance between immune mediators that promote tumor progression vs. mediators that promote tumor rejection. CD4⁺ T regulatory cells, Type 2 CD4⁺ T cells, Type 2 natural killer T cells, myeloid-derived suppressor cells, M2 or tumor-associated macrophages, B cells, and possibly mast cells promote tumor progression, while CD8⁺ T lymphocytes, type 1 CD4⁺ T lymphocytes, natural killer, type 1 natural killer T cells, M1 macrophages, and immune killer dendritic cells promote tumor destruction.

L'incremento delle cellule T CD4⁺CD25⁺Treg è responsabile dell'inibizione della risposta immunitaria adattativa ed innata, in quanto, attraverso l'espressione del CTLA-4 (un segnale inibitorio), esse siano in grado di bloccare sia le cellule T effettrici nei confronti degli Antigeni Associati al Tumore (AAT) sia le cellule NK. A causa di questa alterazione del sistema immunitario, gli attuali approcci immunoterapici contro il tumore si sono rivelati fino ad oggi inefficaci ^{(19) (20)} (Fig.11).

Fig.11



CD4⁺ T lymphocytes are induced by cytokines to produce cytokines that either promote tumor progression or mediate tumor elimination. Type 1 CD4⁺ T cells are induced by IL-12 and IFN γ to produce IFN γ which promotes the differentiation and expansion of CD8⁺ T cells that are cytotoxic for tumor cells. In contrast, IL-4 polarizes CD4⁺ T cells towards a type 2 phenotype that produces IL-4, IL-5, and IL-13 which help B cells produce antibodies, thereby directing immunity away from a tumor-rejecting type 1 response. Under the influence of transforming growth factor β , CD4⁺ T cells develop into T regs that actively block tumor immunity by suppressing tumoricidal CD8⁺ T cells. Recently identified Th17 cells are induced by IL-23 to produce IL-17, which in turn induces cytokines and chemokines that promote inflammation. The resulting inflammatory mediators may contribute to tumor progression by up-regulating immune suppressive cells of the adaptive and innate immune systems

I pazienti con carcinoma del pancreas presentano un'alterata funzione immunitaria e l'aumento delle cellule Treg è stato dimostrato nel sangue periferico, nei linfonodi e nel tessuto pancreatico già a partire dalle lesioni pre-neoplastiche fino allo sviluppo del carcinoma vero e proprio ed in molti casi questo aumento è stato correlato ad una cattiva prognosi e ad una ridotta sopravvivenza⁽²¹⁾⁽²²⁾.

1. ORIGINE E SVILUPPO DELLE CELLULE TREG

Le cellule Foxp3⁺Treg costituiscono dal 5 al 10 % dei Linfociti T CD4⁺, e contribuiscono alla regolazione del sistema immunitario inibendo i processi di proliferazione cellulare⁽²³⁾.

Esse sono indispensabili per il mantenimento della tolleranza immunitaria attiva, dell'omeostasi, della tolleranza ai trapianti e della tolleranza materno-fetale durante la gestazione. La loro alterazione funzionale causa di gravi malattie auto-immunitarie ed allergie⁽²³⁾.

Esse possono, nello stesso tempo, inibire la risposta immunitaria contro i tumori, favorendone la progressione.

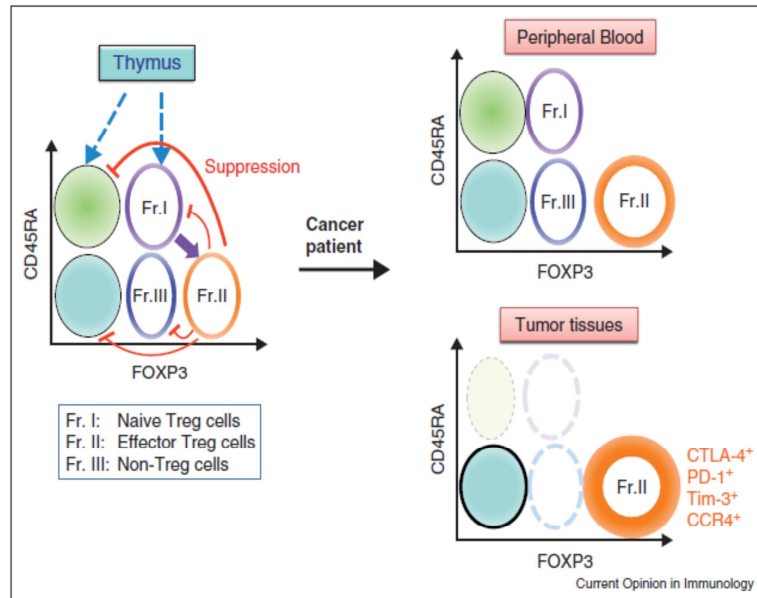
Queste cellule costituiscono una popolazione eterogenea composta da sottogruppi con fenotipi e funzioni differenti.

Le cellule Treg originano principalmente nel **timo** a partire dalla tredicesima settimana di gestazione e a questo stadio di sviluppo, gli organi fetali sono colonizzati da cellule $CD4^+CD25^{hi}$ $Foxp3^+$ Treg antigene-specifici che intervengono nella tolleranza autoimmunitaria ⁽²⁴⁾. Attraverso diversi esperimenti, il fattore di trascrizione intranucleare $Foxp3^+$ è stato indicato come principale regolatore della differenziazione e funzione delle cellule Treg ⁽²⁵⁾. Tuttavia, l'espressione di $Foxp3^+$ sia sulle cellule T $CD4^+$ non-Treg attivate, sia sulle cellule $CD4^+$ Treg nel sangue periferico, lo rende un marcatore poco specifico per le cellule regolatrici ed inoltre testimonia dell'eterogeneità funzionale delle cellule T $Foxp3^+$ nell'uomo. Essendo tuttavia un marcatore di differenziazione intracellulare, la Ricerca si è indirizzata all'individuazione di altri recettori di superficie per poter identificare le cellule Treg. Neanche il fattore CD25, sebbene costitutivamente espresso sulle cellule T $CD4^+$ $Foxp3^+$ ⁽²⁶⁾, può essere considerato come marcatore specifico per le cellule Treg in quanto solo l'~1-2% delle cellule con alti livelli di CD25 nel sangue risultano attivamente inibitorie e possono essere considerate vere e proprie cellule Treg ⁽²⁷⁾. Inoltre l'esistenza di cellule $Foxp3^{low}$ non regolatrici preclude l'uso del fattore Foxp3 come unico marcatore per le cellule Treg umane.

Ne deriva che le cellule T $Foxp3^+$ nell'uomo costituiscono una popolazione fenotipicamente e funzionalmente eterogenea comprendente cellule inibitorie e

non, queste ultime responsabili a loro volta, della produzione di citochine pro-infiammatorie in grande quantità, come l'IL-17 e l' INF- γ ⁽⁹⁾ (Fig.12).

Fig.12



(Left) FOXP3⁺CD4⁺ T cells are dissected into three subpopulations by the expression levels of FOXP3 and the cell surface molecule CD45RA: FOXP3^{hi}CD45RA⁺ cells (Fr. I), designated naive or resting Treg cells, which differentiate into FOXP3^{hi}CD45RA⁻ cells (Fr. II), designated eTreg cells. FOXP3^{hi}CD45RA⁻ non-Treg cells (Fr. III) are not suppressive. eTreg cells (Fr. II) are suppressive on other FOXP3⁺ or FOXP3⁻ T cells, in particular, on CD45RA^{hi} naive CD4⁺ T cells. (Right) eTreg cells (Fr. II) are dominant in tumor tissues but not in the peripheral blood. These eTreg cells express CTLA-4, PD-1, CCR4 and Tim-3.

E' dalla combinazione dei due fattori CD45RA o CD45RO, mutualmente esclusivi, e dal livello di espressione di FoxP3 che è stato possibile individuare le diverse sottopopolazioni di cellule T FoxP3⁺CD4⁺ umane⁽⁹⁾.

In base all'espressione genica differente sono stati quindi individuati due sottogruppi di cellule Treg, entrambi dotati di attività immunosoppressiva in vitro.

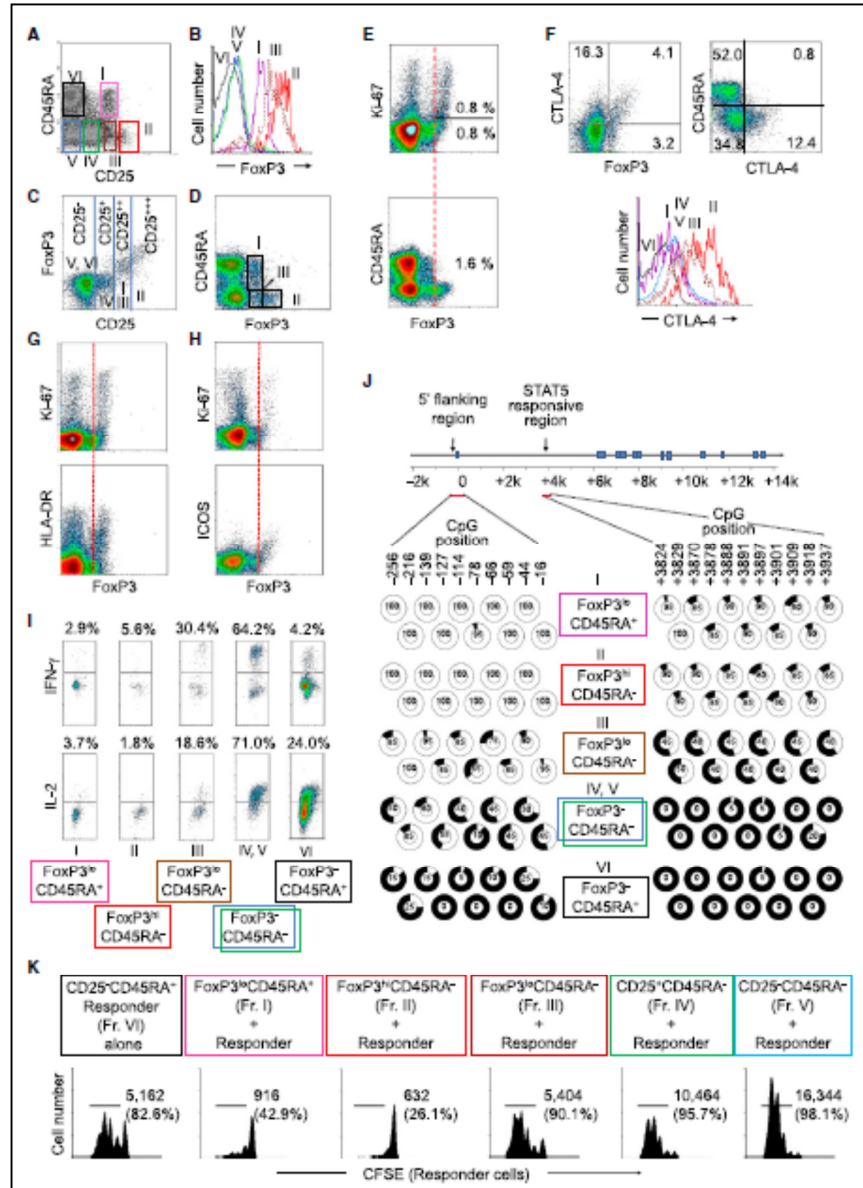
- CD4⁺CD25⁺⁺Foxp3^{low}CDRA⁺ Resting Treg cells (rTreg)
- CD4⁺CD25⁺⁺⁺Foxp3^{hi}CDRA⁻ Activated Treg cells (aTreg)

Le cellule **rTreg** sono CD45⁺RA FoxP3^{low}. Originano **nel timo**. La mancata espressione di Ki67, un fattore di proliferazione nucleare, indica lo stato quiescente “resting” di queste cellule, che, d'altra parte, proliferano dopo stimolazione con TCR in vitro e sono resistenti all'apoptosi⁽⁹⁾.

Le cellule **aTreg** originano **nel tessuto linfatico periferico** dalla conversione delle cellule CD45⁺RA Foxp3^{low} in seguito a stimolazione antigenica ed in presenza di specifiche citochine⁽⁹⁾, sono dotate di una potente attività immunosoppressiva così come sono altamente suscettibili all'apoptosi dopo attivazione e soppressione. Queste cellule esprimono inoltre diversi fattori di attivazione cellulare (CD25, GITR, CD95, CTLA4), ma, ancora più importante, esse esprimono il fattore di proliferazione cellulare **Ki67**. Le cellule aTreg possono essere considerate come il sottogruppo attivato e funzionalmente

differenziato delle cellule Treg. Diversamente rispetto alle cellule rTreg, che predominano nel sangue e rappresentano il principale gruppo di Treg nell'utero, le cellule aTreg sono più rappresentate nell'adulto e nella popolazione anziana. Esse possono essere considerate come delle cellule effettrici mature ad uno stadio terminale di differenziazione, fenotipicamente soppressive e pronte a soccombere rapidamente alla morte cellulare ⁽⁹⁾. L'analisi fenotipica indica inoltre, che, in base all'espressione di altri due fattori di differenziazione (**ICOS e HLA-DR**) le cellule aTreg comprendono a loro volta un sottogruppo (**ICOS+**) che produce delle citochine inibitorie (IL-10 e TGF- β) ed un altro (**HLA-DR+**) con attività secretiva e inibitoria più efficace, che rappresenta lo stadio di differenziazione terminale del pool di cellule aTreg ^{(28) (29)}. (Fig.13).

Fig.13 : Delineation of FoxP3+CD4+ T Cells into Subsets by Cell Surface Molecules, Proliferative State, Cytokine Production, Methylation Status of the FOXP3 Gene, and In Vitro Suppressive Activity



(A–D) Six subsets of CD4+ T cells defined by the expression of CD45RA and CD25: pink line (Fraction [Fr.] I), CD25++CD45RA+ cells; bold red line (Fr. II), CD25+++CD45RA_ cells; broken brown line (Fr. III), CD25++CD45RA_ cells; green line (Fr. IV), CD25+CD45RA_ cells; blue line (Fr. V), CD25_CD45RA_ cells; black line (Fr. VI), CD25_CD45RA+ cells. Expression of FoxP3 (B), CD25 and intracellular FoxP3 (C), and CD45RA and FoxP3 (D) in each fraction shown in (A). Data are representative of 19 blood donors.

(E) Flow cytometry of the expression of nuclear Ki-67 and FoxP3 in CD4+ T cells. Red broken line separates Ki-67+FoxP3hi from Ki-67_FoxP3lo cells and CD45RA+FoxP3lo from CD45RA_FoxP3hi cells. The percentages of Ki-67+ and Ki-67_FoxP3hi cells among CD4+ cells are indicated in the top panel and the percentage of FoxP3hiCD45RA_ cells in the bottom panel.

(F) Flow cytometry of the expression of intracellular CTLA-4 and FoxP3 (top left); CD45RA and CTLA-4 (top right) by CD4+ T cells; and expression of CTLA-4 by each fraction defined in (A)–(D) (bottom). Numbers indicate percent of cells in each quadrant.

(G and H) Expression of Ki-67 and FoxP3 (top) and of HLA-DR or ICOS and FoxP3 (bottom). Red broken line separates Ki-67+FoxP3hi from Ki-67_FoxP3lo cells and HLA-DR_FoxP3lo from HLA-DR+FoxP3hi cells (G) or ICOS_FoxP3lo from ICOS+FoxP3hi cells (H).

(I) Production of IFN- γ , IL-2 by each fraction after stimulation with PMA + ionomycin, and percent of cytokine-secreting cells in each fraction is shown. Data are representative of six independent experiments.

(J) Analysis of DNA methylation status at 50 flanking region (left) and STAT5-responsive (right) region of the FOXP3 gene in FoxP3-expressing or –nonexpressing CD4+ T cell subsets (Figure S1) from PBMCs of one healthy male donor. Percentages of clones displaying demethylation of indicated CpG methylation sites are indicated and depicted in white in sector graphs. 19 to 20 clones were sequenced from each CD4+ T cell subset.

(K) CFSE dilution by 104 labeled CD25_CD45RA+CD4+ responder T cells assessed after 84–90 hr of TCR-stimulated coculture with indicated CD4+ T cell subset at a 1 to 1 ratio. Cell number and percentage of dividing cells per well are indicated. Data are representative of 12 separate experiments.

In relazione alla patologia tumorale, si ritiene che entrambe le sottopopolazioni (rTreg e aTreg) siano coinvolte nel suo sviluppo attraverso un processo di tolleranza immunologica tumore-specifica⁽³⁰⁾.

2. MECCANISMO D'AZIONE DELLE CELLULE Treg

Resta ancora molto da chiarire riguardo al meccanismo preciso alla base dell'attività inibitoria delle cellule Treg. Allo stato attuale, lo studio funzionale di questa popolazione cellulare è limitato ad esperimenti *in vitro* e non esiste ancora evidenza diretta che l'attività *in vitro* rifletta quella *in vivo*⁽²⁴⁾.

Tra le varie ipotesi è stata proposta un'azione modulatrice delle citochine intratumorali, la distruzione metabolica di uno specifico target cellulare, l'alterazione della funzione citolitica delle cellule dendritiche (DC)^{(23) (31)}.

- Le cellule Treg producono delle citochine inibitorie, come l'IL-10 e il TGF- β , capaci di inibire direttamente l'azione delle cellule T effettrici e delle cellule mieloidi⁽³²⁾.

- Un altro possibile meccanismo di inibizione, mediato dalle cellule Treg, consisterebbe nella distruzione di un preciso target cellulare attraverso l'iperegolazione di specifiche molecole di superficie (granzyme-B) ⁽³³⁾.
- Uno studio recente ha mostrato il ruolo cruciale del recettore CTLA-4 per la funzione inibitoria delle cellule Foxp3⁺ Treg sia in vitro che in vivo ⁽³⁴⁾. CTLA4 espresso dalle cellule Treg modulerebbe l'espressione delle molecole CD 80 e CD 86 da parte delle cellule dendritiche (DC) e di conseguenza l'attivazione delle cellule T effettrici ⁽³⁵⁾. E' interessante il dato che nell'uomo solo le cellule CD45RO⁺Foxp3^{hi} Treg esprimono alti livelli di CTLA-4 ⁽⁹⁾.

3. Treg E CANCEROGENESI

Il ruolo delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg nell'immunità tumorale è stato per la prima volta dimostrato da un esperimento in cui la somministrazione in vivo di mAc anti-CD25 ha consentito l'eradicazione di tumori derivati dalla leucemia, dal mieloma e dal sarcoma attraverso la riduzione numerica delle cellule CD4⁺CD25⁺ Treg ⁽³⁶⁾ ⁽³⁷⁾. Attraverso esperimenti sul topo, è stato messo in evidenza come la presenza di cellule CD4⁺ inibisca l'attività delle cellule T effettrici contro il fibrosarcoma ⁽³⁸⁾. Successivamente, la scoperta di un accumulo di cellule Foxp3⁺ Treg in diversi tipi di tumore ha permesso di potenziare la

risposta anti-tumorale naturale ed indotta dai vaccini attraverso la loro rimozione sistemica o locale^{(36) (37) (39)}.

Il coinvolgimento di queste cellule regolatrici nell'immunosoppressione tumorale nell'uomo è stato suggerito dall'osservazione che i pazienti colpiti da diversi tipi di tumore presentavano un elevato numero di cellule Treg nel sangue, nei linfonodi drenanti e nel tessuto tumorale^{(40) (41)}.

Un incremento della popolazione di Treg è stato messo in evidenza in pazienti affetti da carcinoma gastrico, coloretale, ovarico, renale, dell'endometrio, nel colangiocarcinoma, nel tumore polmonare e nell'adenocarcinoma del pancreas^{(15) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59)}. L'infiltrazione di cellule Treg nei linfonodi e nel tessuto tumorale è stata associata ad una prognosi sfavorevole nei pazienti con tumore dell'ovaio, della mammella e dello stomaco^{(7) (8) (40) (42) (43) (44) (51) (60)}.

Inoltre, un elevato numero di linfociti Treg nel sangue come nei linfonodi di drenaggio è considerato come indicatore di malattia metastatica nei pazienti con carcinoma del pancreas^{(21) (22)}.

Liyanage UK, Moore TT et al, hanno messo in evidenza l'aumentata prevalenza di cellule CD4+CD25+ Treg nel microambiente tumorale e nel sangue periferico dei pazienti con carcinoma mammario e del pancreas invasivi⁽⁶¹⁾.

Hiraoka et al, hanno mostrato il significato clinico delle cellule Treg nella progressione dell'ACP. La prevalenza delle cellule Treg nel tessuto dell'adenocarcinoma pancreatico è risultata più elevata rispetto allo stroma delle lesioni non neoplastiche⁽⁶²⁾. Inoltre, come evidenziato in un precedente studio in vitro⁽⁶⁾, questa risposta inibitoria compare precocemente durante il processo di cancerogenesi e si correla con la presenza di metastasi a distanza e stadio tumorale avanzato. L'intervento così precoce delle cellule immunosoppressive durante la cancerogenesi prospetterebbe nello stesso tempo un ruolo preventivo dell'immunoterapia: l'individuazione di inibitori dei macrofagi, MSDC e cellule Treg, i principali artefici di questa attività immunologica inibitoria, a partire già dagli stadi molto precoci dell'induzione tumorale, costituisce una sfida immunoterapeutica interessante.

L'insieme di questi risultati ha contribuito ad avvalorare l'esistenza di una diretta correlazione tra l'aumento delle cellule Treg nel sangue, nei linfonodi e nello stroma tumorale dei pazienti con ACP e l'invasione tumorale locale e a distanza^{(21) (22) (61) (62)}.

Il significato prognostico di queste cellule in relazione ai differenti tumori è riassunto nella tabella 1⁽⁴⁾.

Tabella 1. Significato prognostico delle cellule Treg nel carcinoma

Treg population	Tumor type	Prognostic indicator	Ref.
Elevated tumor infiltrating FoxP3+cells	Breast	Reduced OS	42
		Reduced OS and RFS	43
		Reduced OS and MFS	44
	Ovarian	Reduced OS	45
		Reduced OS and DFS	40
		Improved OS and PFS	46
	Colorectal	(in patients undergoing chemio- or Chemoimmunotherapy)	
		Improved OS	15
		Correlated with disease progression (only Treg in tumor draining lymph nodes)	47
		No association with survival	48
		Reduced OS	49
		(in patients receiving IL-2 immunotherapy)	
		Reduced OS in stage 1 disease	50
	Endometrial	Reduced OS	62
	Pancreatic ductal adenocarcinoma		
	Gastric	Reduced DFS and OS	51
	Follicular lymphoma	Improved OS and PFS	52
		Improved OS (diffuse, but not follicula, FoxP3 staining is associated with PFS, OS and RT)	53
Elevated peritumoral FoxP3+ cells	RCC	Reduced OS and DFS	54
	Colorectal	Reduced OS	15
Intratumoral	Ovarian	High CD8:FoxP3+ ratio associated with increased OS	55
		High CD8:FoxP3+ ratio associated with increased OS and DFS.	56
	Colorectal	No association of CD8:FoxP3 ratio with survival	57
		High CD8:FoxP3 ratio associated with increased OS and DFS	50
	Endometrial	High CD8:FoxP3 ratio associated with increased OS and DFS	58
		High CD8:FoxP3 ratio associated with increased OS and DFS	58
	HCC	High CD8:FoxP3 ratio associated with increased OS and DFS	58
		High CD8:FoxP3 ratio associated with increased OS and DFS	58
Elevated circulating FoxP3+ cells	RCC	Elevated circulating FoxP3+ cells associated with reduced OS	59

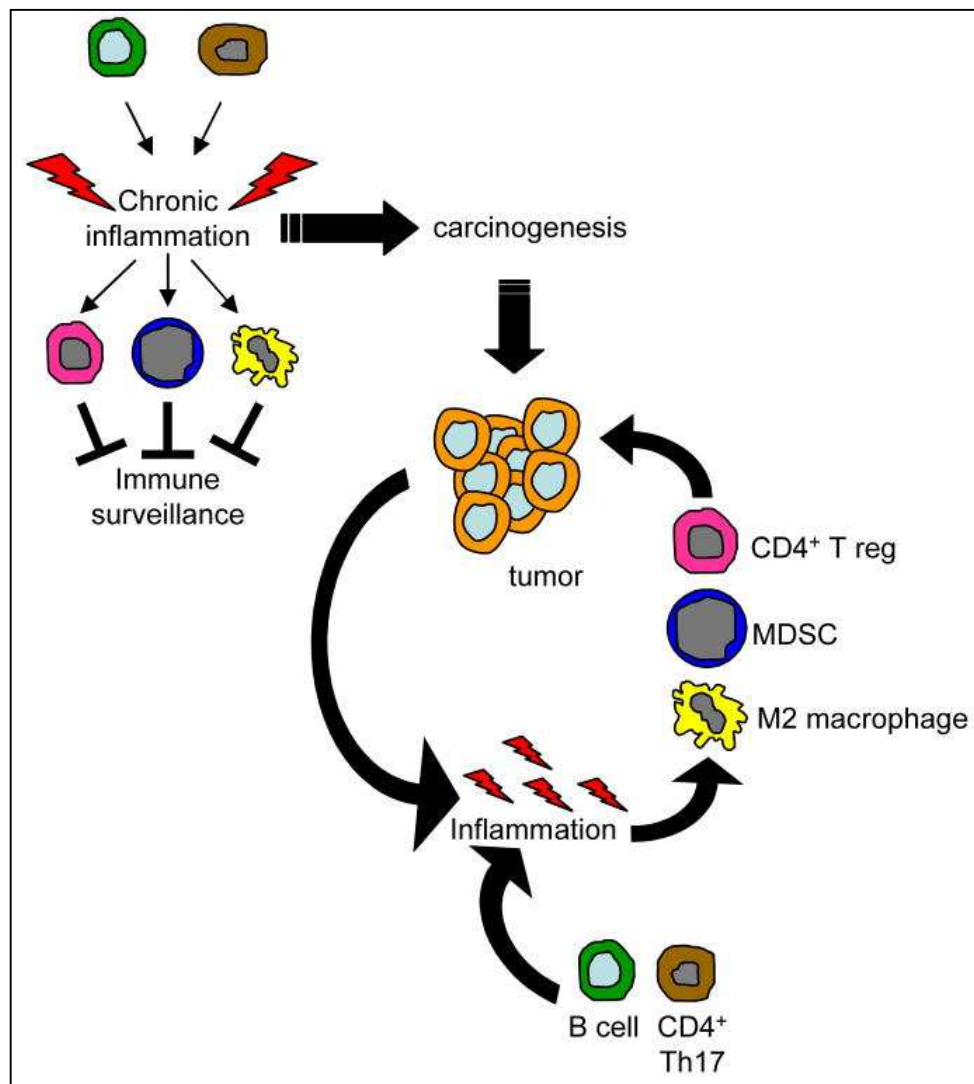
Nonostante i notevoli progressi nella comprensione dei meccanismi di espansione delle cellule Treg nei pazienti con tumore, i meccanismi cellulari e molecolari responsabili dell'aumento di queste cellule rimangono ancora da chiarire.

Diverse ipotesi sono state proposte per cercare di spiegare come le cellule Treg vengano attratte nel tessuto tumorale e come queste ultime sfuggano al controllo del sistema immunitario.

Tra queste, la produzione da parte delle cellule tumorali in fase di proliferazione, di un vasto numero di antigeni (AAT) che indurrebbero il riconoscimento e la migrazione delle cellule Treg^{(63) (64)}.

Lo stato di infiammazione cronica stesso faciliterebbe la perdita della sorveglianza immunitaria nei confronti del tumore, promuovendone lo sviluppo e la crescita (Fig.14).

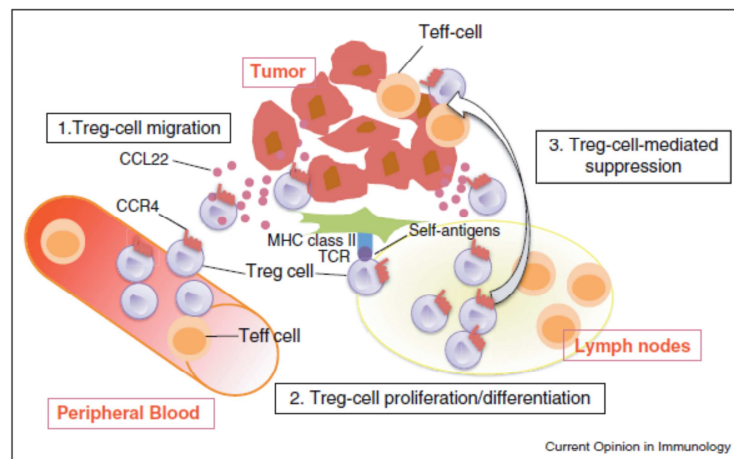
Fig.14



Inflammation may regulate the balance between pro- and anti-tumor immunity by inducing the development of immune mediators that promote carcinogenesis and tumor progression. Activated B cells or possibly CD4⁺ Th17 cells can contribute to an existing state of chronic inflammation or de facto induce inflammation which results in the increase and activation of M2 macrophages, CD4⁺ T regulatory cells, and myeloid-derived suppressor cells. These immune suppressive cells then block immune surveillance, preventing the host's immune system from rejecting pre-malignant cells. In the presence of established tumor, the inflammatory environment is maintained by B cell-secreted factors and possibly CD4⁺ Th17 cells, and by additional factors produced by the tumor cells and by host cells attracted to the tumor site. This increased inflammation induces the accumulation and activation of additional M2 macrophages and myeloid and T suppressor cells which fuel tumor progression.

La chemochina CCL22 prodotta dalle cellule tumorali e dai macrofagi determinerebbe la **migrazione** delle cellule Treg che esprimono il recettore CCR4⁽⁶⁵⁾. L'accumulo nel sito tumorale e nei linfonodi permetterebbe alle cellule Treg, una volta riconosciuti i TAA, di **attivarsi e proliferare**^{(66) (67)}. Le cellule dendritiche (DCs), indotte dalle cellule tumorali, incrementerebbero ulteriormente la proliferazione delle cellule Treg attraverso la produzione di TGF- β ⁽⁶⁸⁾. L'attivazione/proliferazione di queste cellule Treg Foxp3⁺CD25⁺⁺⁺CD4⁺ blocca l'azione antitumorale delle cellule CD8⁺ T citotossiche e delle cellule NK (Fig.15).

Fig.15



FOXP3⁺CD4⁺ Treg cells infiltrate into tumor tissues through chemo-attraction mainly via CCR4-CCL22 and recognize self-antigens including tumor antigens present in tumor tissues. Proliferated/differentiated FOXP3⁺CD4⁺ Treg cells (mainly eTreg cells) efficiently suppress the activation of tumor antigen-specific effector T cells. To evoke and augment anti-tumor immune responses, Treg cells can be targeted at (1) Treg-cell migration, (2) Treg-cell proliferation/differentiation and (3) Treg-cell-mediated suppression.

La maggior reattività delle cellule Foxp3^+ Treg nei confronti delle cellule tumorali rispetto ai Linfociti T CD4^+ attivati risiederebbe nell'espressione di una quantità superiore di molecole di adesione⁽³⁹⁾.

Liu VC, Wong LY, et al⁽⁶⁹⁾ e Chen W et al⁽⁷⁰⁾ hanno mostrato che la produzione da parte delle cellule tumorali di alti livelli di $\text{TGF-}\beta$ induce la conversione in vitro antigene-dipendente delle cellule T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ in cellule T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ dotate di un'attività inibitoria equivalente a quella delle cellule Treg, individuando così un altro meccanismo di evasione alla risposta immunitaria da parte delle cellule tumorali. Un risultato analogo è stato dimostrato su un modello animale nei confronti di un antigene del melanoma⁽⁷¹⁾. Questi risultati hanno però il limite di essere degli studi in vitro o su modelli animali, mentre esistono ancora pochissimi dati per l'uomo che dimostrino la conversione di cellule T convenzionali in cellule Foxp3^+ Treg con attività specificamente inibitoria nel tessuto tumorale⁽⁴⁾.

Un'altra possibile spiegazione all'eccesso di cellule Foxp3^+ Treg nel sangue periferico e nel microambiente tumorale potrebbe essere trovata nell'alterazione dei geni implicati nell'apoptosi⁽⁷²⁾.

L'individuazione del sottogruppo cellulare specifico (rTreg o aTreg) responsabile dell'aumento delle cellule Treg circolanti potrebbe fornire importanti informazioni sul meccanismo di evasione tumorale alla risposta

immunitaria e permettere un approccio terapeutico mirato al preciso processo immunologico coinvolto⁽⁴⁾.

Questa Ricerca si è proposta pertanto di valutare la proporzione di cellule Foxp3⁺Treg dall'analisi della popolazione di cellule T CD4⁺CD25⁺ ed ha dimostrato che esiste una correlazione positiva tra il loro aumento nel sangue periferico e l'ACP, ovvero una correlazione con l'immunopatogenesi tumorale.

La percentuale di cellule CD4⁺CD25⁺⁺⁺CD45RA⁻FoxP3^{hi} (aTreg) circolanti nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas è risultata significativamente più elevata rispetto a quella dei volontari sani ($P<0,001$).

La percentuale di cellule aTreg, più elevata nei pazienti con ACP metastatico rispetto ai pazienti con malattia localizzata suggerisce come i fattori prodotti dal tumore possano indurre un accumulo delle cellule Treg nel sangue periferico e come questo aumento possa a sua volta contribuire alla progressione tumorale.

Un aumento delle cellule aTreg è stato rilevato anche rispetto a diverse patologie infiammatorie dell'apparato digerente, ad indicare il loro diretto coinvolgimento nell'immunità tumorale. Una differenza significativa è stata inoltre trovata tra la concentrazione di cellule aTreg nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas ed i pazienti con tumore del colon-retto ($P<0,05$).

Questi risultati suggeriscono come le cellule CD4⁺Foxp3⁺Treg siano direttamente implicate nell'immunopatogenesi tumorale ed inoltre l'aumento,

all'interno di questo pool cellulare, delle cellule aTreg rispetto alle rTreg, permette di considerare questo specifico sottogruppo cellulare, stadio terminale di attivazione e differenziazione delle cellule Foxp3⁺ Treg, come un importante fattore prognostico nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas.

Mentre restano ancora da determinare i meccanismi precisi che regolano gli effetti inibitori delle cellule Treg, in che misura e attraverso quale meccanismo questo aumento delle aTreg sia dovuto per esempio alla conversione delle cellule CD4⁺CD25⁺ rTreg o piuttosto delle cellule T CD4⁺CD25⁻ non-Treg.

4. LE CELLULE Tregt NELL' IMMUNOTERAPIA ANTI-TUMORALE E PROSPETTIVE FUTURE

L'esistenza di una correlazione tra l'aumento delle cellule Treg e l'immunopatogenesi tumorale costituisce il razionale per manipolare tali cellule al fine di eliminare la loro attività inibitoria e di conseguenza potenziare la risposta antitumorale innata ed indotta⁽¹⁴⁾.

Sulla base di queste osservazioni e degli scarsi risultati ottenuti fino ad ora dalla terapia vaccinica, le attuali ricerche sono volte ad individuare nuove strategie per ridurre le cellule Treg o attenuare la loro attività inibitoria nel sangue come nel tessuto tumorale, attivando nello stesso tempo la risposta immunitaria delle cellule T effettrici, tumore-specifiche. L'individuazione di marcatori biologici di rilevanza prognostica, l'inibizione dei processi di regolazione immunologica

negativa nel sangue e nel microambiente tumorale, la selezione mirata di antigeni per lo sviluppo di vaccini e l'immunoterapia combinata con inibitori specifici costituiscono gli attuali campi di interesse dell'immunoterapia verso i tumori⁽³¹⁾.

In modelli animali, la somministrazione di **mAc anti-CD25**, espresso costitutivamente ed in elevate quantità dalle cellule Treg⁽³⁷⁾, riduce la concentrazione di cellule Treg contribuendo all'eradicazione del tumore dopo la sua inoculazione⁽³⁶⁾. Nell'uomo, la rimozione di CD4⁺CD25⁺ Treg attiva i linfociti T specifici contro gli antigeni tumorali *in vitro*⁽⁷³⁾. Tuttavia, la presenza di CD25 anche sulle cellule T attivate, la cui produzione di IL-2 si rende necessaria per la proliferazione delle cellule T CD8⁺ citotossiche, cancella l'effetto antitumorale ottenuto dalla rimozione delle cellule Treg⁽¹⁴⁾.

L'espressione prevalente del recettore cellulare CCR4 sulle cellule CD25^{hi}CD45RA⁻Foxp3⁺ ma non sulle rTreg né sulle cellule T CD4⁺ attivate nel sangue periferico, rende l'uso dell'**mAc anti-CCR4** una valida alternativa per aumentare l'effetto dell'immunità antitumorale attraverso la rimozione selettiva delle cellule aTreg⁽⁶⁶⁾.

Altre molecole, come **GITR** o **OX40**, espresse costitutivamente ed in grande quantità dalle cellule Foxp3⁺CD4⁺ Treg ma in basse quantità dalle cellule T attivate e dai Linfociti T CD8⁺, sono attualmente utilizzate in trials clinici per

attenuare l'attività inibitoria delle cellule Treg e potenziare quella delle cellule T CD8⁺ effettrici^{(74) (75)}.

Benefici clinici si sono dimostrati strettamente correlati alla diminuzione del numero e dell'attività delle cellule Foxp3⁺ Treg nel tessuto tumorale con conseguente potenziamento della risposta antitumorale, in seguito alla somministrazione dell' **mAc anti-CTLA-4** (Ipilimumab, sottoclasse dell'immunoglobulina IgG1)^{(76) (77) (78)}.

Sutmuller et al⁽¹⁰⁾ hanno osservato un sinergismo tra la terapia con Ab anti-CTLA-4 e la riduzione delle cellule CD25⁺ attraverso l'utilizzo di Ab anti-CD25. L'associazione di queste due terapie risulterebbe più efficace rispetto alla sola monoterapia.

La somministrazione di **Fludarabina** o basse dosi di **Ciclofosfamide (CY)** svolge un'azione antitumorale colpendo selettivamente le cellule Treg, dotate di un'attività proliferativa più spiccata delle altre cellule T⁽⁷⁹⁾. Inoltre, in un lavoro recente⁽⁸⁰⁾, la somministrazione sia di una terapia anticorpale (anti-CD25) che di CY in associazione alla chemioterapia ha reso quest'ultima più efficace attraverso la diminuzione selettiva delle cellule KI-67^{hi} ICOS^{hi} Treg.

Il ruolo critico delle cellule Treg nell'immunità tumorale è oggi diffusamente riconosciuto e la terapia mirata alle cellule Treg è in attiva evoluzione.

Una conoscenza più approfondita dei meccanismi che regolano le cellule Treg o la strategia per controllarle, potrebbe contribuire a trovare delle strategie immunoterapeutiche più efficaci contro l'ACP.

CONCLUSIONI

Nonostante i notevoli progressi ottenuti nel trattamento dell'adenocarcinoma del pancreas, questo tumore resta ancora fortemente chemio e radio-resistente.

Il ruolo attivo della risposta immunitaria nello sviluppo e progressione dei tumori nell'uomo, sulla base di un meccanismo indotto di tolleranza antigenica, costituisce il razionale per l'applicazione di nuove strategie immunoterapeutiche mirate sulle cellule Treg⁽¹⁴⁾.

L'analisi della popolazione linfocitaria T CD4⁺ e dei differenti sottogruppi di cellule Treg ha messo in evidenza come l'aumento della sottopopolazione Treg CD4⁺CD25⁺⁺⁺Foxp3^{hi}, espressione di un'attivazione cellulare terminale specifica e tumore-dipendente, sia correlato al processo di immunosoppressione e progressione tumorale nei pazienti con Adenocarcinoma del Pancreas. La loro rimozione selettiva puo' contribuire a potenziare la naturale risposta immunitaria innata ed indotta.

Il monitoraggio immunologico delle cellule **aTreg** circolanti puo' essere considerato un fattore prognostico per i pazienti con adenocarcinoma del pancreas.

Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per:

- Determinare i meccanismi esatti alla base del processo di evasione tumorale e dell'aumento delle cellule Treg nel sangue periferico, nei linfonodi e nel tessuto tumorale dei pazienti con ACP.
- Interpretare le interazioni dinamiche tra le differenti sottopopolazioni di cellule Treg ed il loro significato clinico-patologico.

Inoltre, una conoscenza più approfondita del meccanismo esatto di inibizione cellulare mediato dalle cellule Treg e dalle sue differenti sottopopolazioni, nel sangue periferico così come nel microambiente tumorale, potrebbe offrire importanti spunti di indagine volti ad inibire selettivamente l'attività specifica delle cellule Treg, evitando in tal modo di compromettere le naturali difese immunitarie ma potenziando nello stesso tempo l'arsenale immunoterapeutico.

E' infatti dalla combinazione della **terapia mirata sulle cellule Treg** (riduzione o attenuazione della loro attività inibitoria nel sangue come nel tessuto tumorale) con l'attivazione delle cellule T effettrici tumore-specifiche (attraverso la terapia vaccinica), che si potranno ottenere dall'immunoterapia dei risultati clinici più promettenti ^{(14) (81)}.

BIBLIOGRAFIA

1. **Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C.** Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med.* 1992, Vol. 326, p. 455-465.
2. **Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF.** Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma: clinic pathological analysis of 5-year survivors. *Ann Surg.* 1996, Vol. 223, p. 273-79.
3. **Beyer M, Schultze JL.** Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 2006, Vol. 108(3), p. 804-811.
4. **Eyad Elkord, Erik M Alcantar-Orozco, et al.** T regulatory cells in cancer: recents advances and therapeutic potential. *Expert Opin.Biol.Ther.* 2010, Vol. 10(11), p. 1573-1586.
5. **Von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, et al.** Systemic and local immunossoppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001, Vol. 7, p. 925-932.
6. **Carolyn E. Clark, Sunil R. Hingorani, Rosemarie Mick, et al.** Dynamic of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion. *Cancer Res.* 2007, Vol. 67(19), p. 9518-27.
7. **Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al.** Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001, Vol. 61, p. 4766-4773.
8. **Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, et al.** CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies : possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer.* 2003, Vol. 98, p. 1089-1099.
9. **Miyara M, Yoshioka Y, Shima T, et al.** Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the Foxp3 transcription factor. *Immunity.* 2009, Vol. 30, p. 1-13.
10. **Sutmuller R P, Van Duivenvoorde L M, Van Elsas A, Schumacher T N, et al.** Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25 regulatory R cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cyytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med.* 2001, Vol. 194, p. 823.
11. *The AJCC Cancer Staging Manual.* Seventh Edition. s.l. : Springer-Verlag, 2010.
12. **Kaplan EL, Meier P.** Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958, Vol. 53, p. 457-481.
13. **Mantel N.** Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 1966, Vol. 50, p. 163-170.

14. **Nishikawa H and Sakaguchi S.** Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*. 2014, Vol. 27, p. 1-7.
15. **Salama P, Phillips M, Grien F, et al.** Tumour-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009, Vol. 27, p. 186-192.
16. **Kawakami Y, Rosenberg SA.** Human tumour antigens recognized by T-cells. *Immunol Res*. 1997, Vol. 16, p. 313-339.
17. **Houghton AN, Guevara-Patino JA.** Immune recognition of self in immunity against cancer. *J Clin Invest*. 2004, Vol. 114, p. 468-71.
18. **Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ.** Natural and adaptative Foxp3+ regulatory t cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009, Vol. 30, p. 626-35.
19. **Ostrand-Rosenberg S.** Immune surveillance: a balance between pro- and anti-tumor immunity. *Curr Opin genet Dev*. 2008, Vol. 18(1), p. 11-18.
20. **Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, et al.** Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2006, Vol. 203, p. 505-11.
21. **Tetsuya I, Takeshi Y, Yuji M, et al.** Clinical roles of increased populations of FoxP3+CD4+T cells in peripheral blood from advanced pancreatic cancer patients. *Pancreas*. 2006, Vol. 33, p. 386-90.
22. **Tomohisa Y, Hiroaki Y, Sohei S, et al.** Circulating CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Patients With Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2012, Vol. (41), p. 409-415.
23. **Sakaguchi S.** Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000, Vol. 101, p. 455-458.
24. **Sakaguchi S, Miyara M, Costantino MC, Hafler DA.** FOXP3+regulatory T cells in the human immune system. *Immunology*. 2010, Vol. 10, p. 490-500.
25. **Fontenot JD, Gavin Ma, Rudensky AY.** FoxP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003, Vol. 4, p. 330-6.
26. **Sakagushi S, Sakaguchi N, Asano M et al.** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha (chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995, Vol. 155, p. 1151-64.
27. **Allan S E, et al.** Activation-induced Foxp3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*. 2007, Vol. 19, p. 345-354.
28. **Ito T, et al.** Two functional subsets of FoxP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*. 2008, Vol. 28, p. 870-880.
29. **Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler D.** MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J Immunol*. 2006, Vol. 176, p. 4622-31.
30. **Zhou G, Levitsky HI.** Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol*. 2007, Vol. 178, p. 2155-62.

31. **Gajewski T and Schumacher T.** Cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*. 2013, Vol. 25, p. 259-260.
32. **Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL.** A unique subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2007, Vol. 13, p. 4345-4354.
33. **Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ.** Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004, Vol. 21, p. 589-601.
34. **Wing K et al.** CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*. 2008, Vol. 322, p. 271-275.
35. **Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al.** Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000, Vol. 192, p. 303-310.
36. **Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, et al.** Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999, Vol. 59, p. 3128-33.
37. **Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S.** Induction of tumory immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999, Vol. 163, p. 5211-8.
38. **Awwad M, and North R J.** Cyclophosphamide-induced immunologically mediated regression of a cyclophosphamide-resistant murine tumor: a consequence of eliminating precursors L3T4⁺ suppressor-T cells. *Cancer Res*. 1989, Vol. 49, p. 1649.
39. **Sakaguchi S.** Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol*. 2004, Vol. 22, p. 531-562.
40. **Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al.** Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004, Vol. 10, p. 942-9.
41. **Wolf AM, Wolf D, Steurer M, et al.** Increase of regulatory T cells in peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2003, Vol. 9, p. 606-612.
42. **Xu L, Xu W, Qui S, Xiong S.** Enrichment of CCR6⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8⁺ T cell function and poor prognosis of breast cancer. *Clin Immunol*. 2010, Vol. 135, p. 466-75.
43. **Bates GJ, Fox SB, Han C, et al.** Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006, Vol. 24, p. 5373-80.
44. **Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al.** FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009, Vol. 27, p. 1746-52.

45. **Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, et al.** The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2005, Vol. 11, p. 8326-31.
46. **Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, et al.** regulatory (Foxp3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J Immunother.* 2010, Vol. 33, p. 435-41.
47. **Deng L, Zhang H, Luan Y, et al.** Accumulation of foxp3+ T regulatory cells in draining lymph nodes correlates with disease progression and immune suppression in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2010, Vol. 16, p. 4105-12.
48. **Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G.** Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006, Vol. 12, p. 3355-60.
49. **Jensen HK, Donskov F, Nordsmark M, et al.** Increased intratumoral FOXP3+ regulatory immune cells during interleuchin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009, Vol. 15, p. 1052-58.
50. **de Jong RA, Leffers N, Boezen HM, et al.** Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2009, Vol. 114, p. 105-110.
51. **Perrone G, Ruffini PA, Catalano V, et al.** Intratumoral FOXP3+ regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2008, Vol. 44, p. 1875-82.
52. **Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al.** High numbers of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells are associated with improved survival in follicular lymphoma. *Blood.* 2006, Vol. 108, p. 2957-64.
53. **Farihna P, Al-Tourah A, Gill K, et al.** The architectural pattern of FOXP3+ T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood.* 2010, Vol. 115, p. 289-95.
54. **Li JF, Chu YW, Wang GM, et al.** The prognostic value of peritumoral regulatory T cells and its correlation with intratumoral cyclooxygenase-2 expression in clear cell renal carcinoma. *BJU Int.* 2009, Vol. 103, p. 399-405.
55. **Sato E, Olson SH, Ahn J, et al.** Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005, Vol. 102, p. 18538-43.
56. **Suzuki H, Chikazawa N, Tasaka T, et al.** Intratumoral CD8(+) T/FOXP3 (+) cell ratio is a predictive marker for survival in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2001, Vol. 59, p. 653-61.
57. **Loddenkemper C, Schernus M, Noutsias M, et al.** In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *J Transl Med.* 2006, Vol. 4, p. 52.

58. **Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al.** Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol.* 2007, Vol. 25, p. 2586-93.
59. **Griffiths RW, Elkord E, Gilham DE, et al.** Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol Immunother.* 2007, Vol. 56, p. 1743-53.
60. **Szczepanik AM, Siedlar M, Sierzega M, et al.** T-regulatory lymphocytes in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2011, Vol. 17(3), p. 343-348.
61. **Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G, et al.** Prevalence of Regulatory T Cells Is Increased in Peripheral Blood and Tumor Microenvironment of Patients with Pancreas or Breast Adenocarcinoma. *The Journal of Immunology.* 2002, Vol. 169, p. 2756-61.
62. **Nobuyoshi Hiraoka, Kaoru Onozato, Tomoo Kosuge and Setsuo Hirohashi.** Prevalence of FoxP3+ Regulatory T Cells Increases During the Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Its Premalignant Lesions. *Clin Cancer Res.* 2006, Vol. (12)18, p. 5423-5433.
63. **Nishikawa H, Kato T, Tawara I, et al.** Definition of target antigens for naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2005, Vol. 201, p. 681-6.
64. **Schabowsky RH, Madireddi S, Sharma R, et al.** Targeting CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells for the augmentation of cancer immunotherapy. *Curr Opin Investing Drugs.* 2007, Vol. 8(12), p. 1002-1008.
65. **Nishikawa H, Sakaguchi S.** Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer.* 2010, Vol. 127, p. 759-67.
66. **Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, et al.** Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type Foxp3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013, Vol. 110, p. 17945-17950.
67. **Ishida T, Ishii T, Inagaki A, et al.** Specific recruitment of CC chemokine receptor 4-positive regulatory T cells in Hodgkin lymphoma fosters immune privilege. *Cancer Res.* 2006, Vol. 66, p. 5716-22.
68. **Valsazina B, Piconese S, Guiducci C, Colombo MP.** Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res.* 2006, Vol. 66, p. 4488-95.
69. **Liu VC, Wong LY, Jang T, et al.** Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol.* 2007, Vol. 178, p. 2883-92.
70. **Chen W, Jin W, Hardegen N, et al.** Conversion of peripheral CD4+CD25- naïve T cells to CD4+CD25+regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor FoxP3. *Science.* 2003, Vol. 198, p. 1875-86.

71. **Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, et al.** Effect of CD4+CD25+ and CD4+CD25- T regulatory cells on the generation of cytolytic t cell response to a self but human tumor-associated epitope in vitro. *J Immunol.* 2006, Vol. 176, p. 984-90.
72. **Jeron A, Pfoertner S, Bruder D, et al.** Frequency and gene expression profile of regulatory T cells in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2009, Vol. 30, p. 160-70.
73. **Nishikawa H, Jager E, Ritter G, et al.** CD4+CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood.* 2005, Vol. 106, p. 1008-1011.
74. **Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, et al.** Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol.* 2002, Vol. 3, p. 135-142.
75. **Piconese S, Valsazina B, Colombo MP.** OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J Exp Med.* 2008, Vol. 205, p. 825-839.
76. **Hodi FS, Butler M, Oble DA, et al.** Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013, Vol. 2008, p. 3005-3008.
77. **Liakou CI, Kamat A, Tang DN, et al.** CTLA-4 blockade increase INF γ -producing CD4+ICOS hi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008, Vol. 105, p. 14987-14992.
78. **Mark JS, John JE, Michael Q, et al.** Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res.* 2013, Vol. 1, p. 32-42.
79. **Beyer M, Kochanek M, Darabi K, et al.** Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25 hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood.* 2005, Vol. 106, p. 2018-2025.
80. **Van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, et al.** Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells : a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009, Vol. 58, p. 1219-28.
81. **Dannull J, Su Z, Rizzieri D, et al.** Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2005, Vol. 115, p. 3623-33.